

# **Tubulysin aus Myxobakterien: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Genehmigte

**Dissertation**

Von

Mohamed-Wasim Mohamed Khalil

aus Giza-Ägypten

**1. Referent:** Prof. Dr. Hans Reichenbach  
**2. Referentin:** Frau Prof. Dr. Brigitte Jockusch  
**eingereicht am:** 15.03.1999  
**mündliche Prüfung (Disputation) am:** 12.05. 1999

Die vorliegende Doktorarbeit entstand in der Zeit von März 1996 bis Dezember 1998 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans Reichenbach in der Arbeitsgruppe Naturstoffbiologie (ehemals Mikrobielle Sekundärstoffe) an der GBF. Ihm möchte ich sehr herzlich danken, daß er mir die Freiheit ließ, eigene Ideen zu entwickeln und dabei immer zu anregenden, kritischen und die Arbeit fördernden Diskussionen und Unterstützungen bereit war.

Für die Überahme des Korreferates und Hinweise zum Abschluß der Arbeit möchte ich Frau Dr. Prof. Birgitte Jockusch danken.

## II

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Dr. Florenz Sasse für seine großzügige, immerwährende Hilfsbereitschaft und seine stete Ansprechbarkeit, ebenso für die Bereitstellung von Tubulysin.

Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf und Frau Elke Haase (Elektronenmikroskopie der Abteilung Mikrobiologie an der GBF) für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Den Kollegen aus Labor D 1.02 für eine interessante Zusammenarbeit und alle anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Naturstoffbiologie (GBF) für ihre Hilfsbereitschaft.

Schließlich ein besonderer Dank an meine Mutter, die mir das Studium in Ägypten und Deutschland bis zum Abschluß ermöglicht hat und an meine Frau, die mich immer motivierte und mir immer Kraft gab.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b><u>Einleitung, theoretische Grundlage und Aufgabenstellung</u></b>	<b>1</b>
1.1	Das eukaryotische Cytoskelett.....	1
1.2	Mikrotubuli.....	1
1.2.1	Der Aufbau der Mikrotubuli.....	1
1.2.2	Die Tubulinpolymerisation <i>in vitro</i> .....	2
1.2.3	Bildung von Tubulinringen.....	3
1.2.4	Die biologischen Funktionen der Mikrotubuli.....	3
1.2.5	Tubulin/Mikrotubuli, die dynamische Stabilität.....	4
1.2.6	Mikrotubuli und die Zellteilung .....	5
1.3	Antimitotische Wirkstoffe.....	6
1.3.1	Allgemein.....	6
1.3.2	Taxol und Taxotere.....	6
1.3.3	Epothilon aus Myxobakterien.....	7
1.3.4	Colchicin .....	8
1.3.5	Vinblastin.....	9
1.3.6	Phomopsin A.....	10
1.3.7	Dolastatin.....	11
1.4	Myxobakterien.....	12
1.4.1	Cytostatika aus Myxobakterien .....	13
1.4.2	Tubulysine.....	14
1.5	Aufgabenstellung.....	14
<b>2.</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b> .....	<b>16</b>
2.1	Chemikalien.....	16

2.2	Puffer.....	16
2.3	Geräte.....	18
2.4	Zelllinien und Kulturmedien.....	19
2.4.1	PtK <sub>2</sub> (NBL-5, ATCC CCL 56).....	19
2.4.2	L929 (NCTC clone 929, ATCC CCL1).....	19
2.4.3	K-562 (ATCC CCL 243).....	19
2.4.4	HL-60 (ATCC CCL 240).....	19
2.4.5	U-937 (DSM ACC 5).....	19
2.4.6	KB-3.1 (DSM ACC 158).....	20
2.5	Allgemeines zur Zellkultivierung.....	20
2.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	22
2.7	Bestimmung der Zellzahl.....	23
2.8	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen.....	23
2.8.1	Romanowsky-Giemsa-Färbung.....	23
2.8.2	Vitalitätstest.....	23
2.8.3	MTT-Test.....	24
2.8.4	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	24
2.8.4.1	Zellenvorbereitung.....	24
2.8.4.2	Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli.....	25
2.8.4.3	Färbung der Zellkerne.....	25
2.8.4.4	Actin-Filamenten.....	25
2.8.4.5	Einbettung.....	25
2.8.4.6	Mikroskopie und Photodokumentation.....	26
2.8.5	Immunzytofluorometrie.....	26
2.8.6	Zellzyklusuntersuchungen.....	26
2.8.7	Zellsynchronisation.....	27
2.8.8	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	28
2.8.8.1	Zellvorbereitung und Fixierung.....	28
2.8.8.2	Entwässerung, Einbettung und Polymerisation.....	29
2.8.8.3	Ultramikrotomie und Doppelkontrastierungen.....	29
2.8.9	Apoptose-Bestimmungen.....	30

2.8.9.1	Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente.....	30
2.8.9.2	Bestimmung von DNA-Fragmenten.....	31
2.8.9.3	Nachweis der Apoptoseleiter.....	35
2.9	In vitro-Untersuchungen.....	37
2.9.1	Isolierung von Mikrotubuliprotein aus Schweinehirn.....	37
2.9.2	Herstellung von MAP-freiem Hirntubulin (PC-Tubulin).....	38
2.9.3	Herstellung von GTP- und Mg-freiem Tubulin.....	39
2.9.4	Proteinbestimmung.....	39
2.9.5	Elektrophoretische Methoden.....	40
2.9.5.1	Vorbereitung von Proben für die Gelelektrophorese.....	40
2.9.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
2.9.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung von $\alpha$ -und $\beta$ -Tubulin.....	42
2.9.6	Tubulin-Polymerisation.....	42
2.9.6.1	Polymerisations-Tests zur Messung der Mikrotubuli-Bildung.....	42
2.9.6.2	Der Einfluß von Wirkstoffen auf die Tubulin Polymerisation.....	43
2.9.6.3	Einwirkung von Tubulysin auf polymerisiertes Tubulin (Mikrotubli)...	44
2.9.6.4	Die Einwirkung von Tubulysin auf eine durch Taxol- induzierte Tubulin-Polymerisation.....	44
2.9.7	Elektronenmikroskopie: Negativ-Kontrastierung.....	45
2.9.8	Untersuchungen zur Bindungsart des Tubulysins an Tubulin.....	46
2.9.9	Interaktion zwischen Tubulin und Tubulysin.....	47
2.9.9.1	Die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulinalkylierung mit Jod[ $^{14}\text{C}$ ]acetamid.....	48
2.9.9.2	Die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulin-Alkylierung durch <i>N,N'</i> -Ethylenbis-(jodacetamid) (EBI).....	48
2.9.10	Der Einfluß von Tubulysin auf den Tubulin-Zerfall (Tubulin decay)....	49
2.9.11	Messung der GTPase-Aktivität der Mikrotubuli.....	50

<b>3.</b>	<b><u>In-vivo-Ergebnisse</u></b> .....	<b>53</b>
3.1	Einwirkung von Tubulysin auf die Zellmorphologie.....	53
3.2	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	55
3.2.1	Einwirkung von Tubulysin auf die Zellmikrotubuli.....	55
3.2.2	Wirkung von Tubulysin auf das Aktin-Cytoskelett der Zelle.....	56
3.2.3	Entfernung von Tubulysin A durch Auswaschen aus PtK <sub>2</sub> -Zellen.....	59
3.2.4	Prüfung auf additive oder synergistische Effekte von Tubulysin und Taxol.....	59
3.2.5	Prüfung auf additive oder synergistische Effekte von Tubulysin und Epothilon B.....	60
3.2.6	Prüfung auf additive oder synergistische Effekte von Tubulysin und Vinblastin.....	60
3.2.7	Prüfung auf additive oder synergistische Effekte von Tubulysin und Colchicin.....	62
3.2.8	Immuncytofluorometrie.....	64
3.3	Einfluß von Tubulysin auf den Zellzyklus.....	65
3.4	Untersuchung zur Apoptose-Induktion durch Tubulysin.....	68
3.4.1	Bestimmung des Zelltods.....	68
3.4.2	Bestimmung der DNA-Fragmentierung.....	68
3.4.3	Bestimmung der Apoptoseleiter als Nachweis für Apoptoseinduktion durch Tubulysin.....	70
<b>4.</b>	<b><u>In Vitro-Ergebnisse</u></b> .....	<b>72</b>
4.1	Reinigung und Qualität von Tubulin aus Schweinehirn.....	72
4.2	Einfluß von Epothilon auf die Ausbeute an Mikrotubuli-proteinen.....	72
4.3	Messung der Tubulinpolymerisation <i>in vitro</i> .....	74
4.3.1	Vorbereitung der Tubulin-Präparate.....	74
4.3.2	Auswahl der Methode .....	74
4.3.3	Tubulinpolymerisation in Gegenwart von Tubulysin.....	75



4.3.4	Quantifizierung der Hemmwirkung von Tubulysin.....	76
4.3.5	Die Wirkung des Tubulysins im Vergleich mit anderen antimitotischen Wirkstoffen.....	78
4.3.6	Depolymerisation von Mikrotubuli durch Tubulysin.....	79
4.3.7	Hemmung der Tubulinpolymerisation durch Tubulysin in Anwesenheit von Taxol .....	80
4.3.8	Hemmung der Tubulinpolymerisation durch Tubulysin in Anwesenheit von Epothilon.....	83
4.3.9	Depolymerisierung der stabilisierten Mikrotubuli durch Tubulysin.....	85
4.4	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	86
4.4.1	Entstehung von Ringstrukturen durch Einwirkung des Tubulysins.....	86
4.5	Untersuchung zur Bindungsstelle des Tubulysins an Tubulin.....	88
4.5.1	Konkurrenz von Tubulysin zu Colchicin und Vinblastin.....	88
4.6	Interaktion zwischen Tubulin und Tubulysin.....	91
4.6.1	Die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulinalkylierung mit Iod[ <sup>14</sup> C]acetamid.....	91
4.6.2	Die Einwirkung der Tubulysine auf die Tubulin-Alkylierung durch <i>N,N'</i> -Ethylenebis(iodacetamid) (EBI).....	92
4.6.3	Die Einwirkung von Tubulysin auf den Tubulin-Zerfall (Decay).....	93
4.7	Die Einwirkung von Tubulysin auf die GTPase-Aktivität des Mikrotubuli-Systems.....	94
<b>5.</b>	<b><u>Diskussion</u></b> .....	<b>96</b>
5.1	Allgemeines zur Wirkung von Tubulysin.....	96
5.2	Tubulysin und Mikrotubulicytoskelett.....	97
5.3	Die antimitotische Wirkung des Tubulysins.....	98
5.4	Apoptose Induktion durch das Tubulysin.....	99
5.5	Die Tubulinpolymerisation <i>in vitro</i> .....	101
5.6	Hemmung der Tubulinpolymerisation.....	101
5.7	Die Bildung von Ringstrukturen.....	103

---

5.8	Konkurrenz von Tubulysin zu Colchicin und Vinblastin.....	104
5.9	Interaktion zwischen Tubulin und Tubulysin.....	104
5.10	Untersuchung zur GTPase-Aktivität des Tubulins.....	107
<b><u>5.</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b> .....	108
<b><u>6.</u></b>	<b><u>Literatur</u></b> .....	112
	<b><u>Lebenslauf</u></b>	

**Verwendete Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP, ADP, AMP	Adenosin-5'-tri, di, monophosphat
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxy-uridin
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
Ci	Curie
°C	Grad Celsius
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
DTT	D,L-Dithiothreitol
EBS-Puffer	Earle's physiologische Salze
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Em	Elektronenmikroskop
F-Aktin	Filamentöses Aktin (Polymerisiert)
FBS	Fötale Rinderserum (foetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G-Aktin	Globuläres Aktin (Monomer)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IC <sub>50</sub>	Konzentration, die zu einer 50%igen Hemmung führt
kDa	Kilodalton

---

<i>K<sub>i</sub></i>	Bindungskonstante
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure
MESG	2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin-ribosid
min.	Minuten
M-Phase	Mitosephase
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
MTP	Mikrotiterplatten
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCS	Natives Kälberserum (native calf serum)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Lösung (phosphat buffered saline)
PC	Phosphocellulose
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PNP	Purinnukleosid-Phosphorylase
POD	Peroxidase
S-Phase	Synthesephase (der DNA)
s	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vb/Vc	Vinblastin/ Vincristin

**Verzeichnis der Abbildungen**

Abb. 1.1	Die chemische Struktur von Taxol und Taxotere.....	7
Abb. 1.2	Die chemische Struktur von Epothilon A und B.....	8
Abb. 1.3	Die chemische Struktur von Colchicin und Colchicin-Derivaten.....	9
Abb. 1.4	Die chemische Struktur von Vinblastin.....	10
Abb. 1.5	Die chemische Struktur von Phomopsin A.....	11
Abb. 1.6	Die chemische Struktur von Dolastatin.....	12
Abb. 1.7	Die chemische Struktur von Tubulysin A.....	14
Abb. 2.1	Die enzymatische Umsetzung von 2-Amino-6- mercapto-7-methylpurin-ribosid.....	51
Abb. 3.1	Wirkung von Tubulysin auf die Zellmorphologie.....	54
Abb. 3.2	Wirkung von Tubulysin auf die Zellkerne von PtK <sub>2</sub> -Zellen.....	57
Abb. 3.3	Immunfluoreszenzaufnahmen von PtK <sub>2</sub> -Zellen mit Antikörpern gegen $\alpha$ -Tubulin.....	58
Abb. 3.4	Die Wirkung Tubulysin auf PtK <sub>2</sub> -Zellen nach einer Vorbehandlung mit Taxol oder Epothilon.....	61
Abb. 3.5	Prüfung auf additive Effekte von Tubulysin und Vinblastin .....	63
Abb. 3.6	Immuncytofluorometrie von PtK <sub>2</sub> -Zellen.....	64
Abb. 3.7	Einfluß von Tubulysin auf den Zellzyklus in L929-Zellkulturen..	66
Abb. 3.8. A	Anteile der verschiedenen Phasen in den L929-Zellkulturen nach Behandlung mit Tubulysin.....	67
Abb. 3.8. B	Anteile der verschiedenen Phasen in den HL 60-Zellkulturen nach Behandlung mit Tubulysin.....	67
Abb. 3.9	Zunahme der Nukleosomenzahl nach Behandlung mit Camptothecin und Tubulysin als Anzeichen einer Apoptose.....	79
Abb. 3.10	DNA-Fragmentierung als Anzeichen einer Apoptose nach Behandlung von U-937-Zellen mit Tubulysin.....	79
Abb. 3.11	Apoptoseleiter als Anzeichen einer Apoptose.....	71

Abb. 3.12	Regelmäßige Größenzunahme der einzelnen DNA-Banden nach Behandlung von U-937 Zellen mit Tubulysin.....	71
Abb. 3.13	Tubulin-Reinigungsschritte mittels PAGE .....	73
Abb. 3.14	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Schweinehirn Mikrotubuli.....	73
Abb. 3.15	Wirkung von Tubulysin auf die Tubulinpolymerisation.....	75
Abb. 3.16	Die Wirkung verschiedener Tubulysin Konzentrationen auf die Polymerisation von Tubulin.....	77
Abb. 3.17	Quantifizierung der Hemmwirkung von Tubulysin.....	77
Abb. 3.18	Tubulinpolymerisation in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe.....	79
Abb. 3.19	Einfluß verschiedener Tubulysin Konzentrationen auf die <i>in vitro</i> Depolymerisation der Mikrotubuli.....	80
Abb. 3.20	Wirkung von Tubulysin auf eine Taxol-induzierte Tubulin-Polymerisation.....	82
Abb. 3.21	Einfluß von Taxol auf die Tubulinpolymerisation in Gegenwart von Tubulysin.....	82
Abb. 3.22	Die Wirkung von Tubulysin auf eine Epothilon-induzierte Tubulinpolymerisation .....	84
Abb. 3.23	Aufhebung der Wirkung von Epothilon und Taxol durch Tubulysin.....	84
Abb. 3.24	Wirkung von Tubulysin auf die durch Taxol oder Epothilon stabilisierten Mikrotubuli.....	85
Abb. 3.25	Elektronenmikroskopische Aufnahme zeigen die Wirkung von Tubulysin auf die Tubulinpolymerisation <i>in vitro</i> .....	87
Abb. 3.26	Das Elutionsprofil der Proteinfractionen von einer PD-10-Säule mit Sephadex-G 25.....	89
Abb. 3.27	Konkurrenz zwischen Tubulysin und Vinblastin bzw. Colchicin um die Bindung an Tubulin.....	90
Abb. 3.28	Bindung steigender Vinblastinmengen an Tubulin ohne und mit Tubulysin .....	90
Abb. 3.29	Die Alkylierung von Tubulin durch Iod[ <sup>14</sup> C]acetamid.....	92
Abb. 3.30	PAGE von Tubulin nach Alkylierung durch EBI.....	93

---

Abb. 3.31	Bestimmung des Tubulin- Zerfalls durch den Tubulin- Bis-ANS-Bindungsassay.....	94
Abb. 3.32	Die Wirkung von Tubulysin auf die GTPase Aktivität des Tubulins.....	95

**Verzeichnis der Tabellen**

Tab. 2.1	Die Zusammensetzung von EBS (Earles physiologische Salzlösung) und PBS (Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung).....	17
Tab. 2.2	Eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien und deren.....	21
Tab. 2.3	Übersicht über die verwendeten Kulturgefäße und Medienvolumina.....	22
Tab. 2.4	Zusammensetzung der Wasch- und Fixierpuffer für die TEM.....	28
Tab. 2.5	Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers (zweifach konzentriert).....	40
Tab. 2.6	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	41



## **1 Einleitung, theoretische Grundlage und Aufgabenstellung**

### **1.1 Das eukaryotische Cytoskelett**

Eukaryotische Zellen besitzen ein Cytoskelett aus Proteinfilamenten, das für die Form der Zellen, ihre Bewegung und den Transport ihrer subzellulären Strukturen, vor allem der Chromosomen, sowie für die Plasmaströmung bei Algen und das Schlagen von Cilien und Geißeln verantwortlich ist. Man kann mindestens drei verschiedene Filament-Typen unterscheiden: Aktin-Mikrofilamente, Intermediär-Filamente und Mikrotubuli (Durchmesser 7, 10 bzw. 24 nm).

### **1.2 Mikrotubuli**

#### **1.2.1 Der Aufbau der Mikrotubuli**

Die Mikrotubuli sind aus Tubulin-Einheiten aufgebaut. Tubulin ist ein hoch konserviertes, globuläres Protein, das in den Mikrotubuli in zwei strukturell verwandten Formen vorkommt, dem  $\alpha$ -Tubulin mit einem Molgewicht von 53 kDa und dem  $\beta$ -Tubulin, das 55 kDa groß ist. Das von beiden Formen gebildete  $\alpha/\beta$ -Heterodimer ist die eigentliche Untereinheit der Mikrotubuli. Jedes Heterodimer bindet zwei Moleküle GTP, ein nicht austauschbares an  $\alpha$ -Tubulin und ein austauschbares an  $\beta$ -Tubulin. Das letztere wird bei Anlagerung eines weiteren Heterodimers während die Tubulinpolymerisation zu GDP hydrolysiert. Die dadurch freigesetzte Energie wird für den Aufbau der Mikrotubuli verwendet, mehrere Mikrometer lange Röhren, die das Innere der Zellen durchziehen. Die Mikrotubuliwand besteht aus den abwechselnd angeordneten und gegeneinander versetzten Protofilamenten aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Molekülen, wobei die Untereinheiten eine helikale Anordnung einnehmen. Ein Mikrotubulus besteht meistens aus 13 Protofilamenten, die parallel zur Mikrotubulus-Achse verlaufen. In einem Protofilament wechseln sich  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten der Dimere ab, und rufen so eine Polarität des Mikrotubulus hervor. Zudem sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten benachbarter Protofilamente gegeneinander verschoben. Ein Mikrotubulus hat einen Durchmesser von 24 nm. In einem ruhenden Fibroblasten sind die Mikrotubuli radial angeordnet und gehen (bei tierischen Zellen) sternförmig vom Centrosom aus, das als Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) bezeichnet wird. Mit

den Mikrotubuli eng verbunden sind eine Reihe sogenannter Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAPs), die bei der Reinigung zusammen mit dem Tubulin isoliert werden. Sie stabilisieren die Mikrotubulstruktur und sind für die Vermittlung der Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und anderen Zellbestandteilen verantwortlich. Man unterscheidet dabei zwischen den hochmolekularen MAPs (250-350 kDa) und den tau-Proteinen (40-60 kDa). Beide Klassen haben zwei Domänen, von denen eine an Mikrotubuli bindet. Die andere scheint der Verknüpfung zu anderen Zellkomponenten zu dienen. Da die Mikrotubuli-bindende Domäne gleichzeitig an mehrere nicht-polymerisierte Tubulin-Moleküle binden kann, beschleunigen MAPs *in vitro* den Nukleationsschritt der Polymerisation.

### 1.2.2 Die Tubulinpolymerisation *in vitro*

Wenn man die aus Hirnzellen oder anderen Quellen (wie Spermien, Geißeln bestimmter Protozoen) gewonnenen Mikrotubuli abkühlt, depolymerisieren sie unter Bildung stabiler Tubulinuntereinheiten, dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Diese als Tubulin bezeichneten Untereinheiten polymerisieren *in vitro* in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer bei  $37^\circ\text{C}$  in Gegenwart von GTP unter Rückbildung der Mikrotubuli. Die Bildung von Mikrotubuli *in vitro* ist also temperaturabhängig (Weisenberg, 1972; Borisy und Olmsted, 1972; Olmsted und Borisy, 1973). Physiologische Temperaturen sowie  $\text{Mg}^{2+}$ , GTP und MAPs fördern die Polymerisation, während niedrige Temperaturen bzw. eine Zugabe von GDP,  $\text{Ca}^{2+}$  oder Wirkstoffen wie Colchicin, Vinblastin oder Phalloidin, die Polymerisation inhibieren. Die Charakterisierung von isoliertem Tubulin erfolgt mittels SDS-PAGE, Proteinbestimmung und Negativstain-Elektronenmikroskopie. Durch die turbidimetrische Verfolgung der Polymerisation bei 350 nm erhielt man im Idealfall eine sigmoide Kurve, die drei Stadien erkennen läßt.

- **Die Nukleationsphase :** Hier bilden sich die Polymerisationskerne, wobei keine Extinktionszunahme zu beobachten ist. Die Länge der Nukleationsphase hängt von der Temperatur und der Konzentration des Tubulins ab.
- **Die Elongationsphase :** Hier lagern sich die Tubulindimere sehr schnell an die Polymerisationskerne an, bis eine maximale Extinktion erreicht wird.
- **Die stationäre Gleichgewichtsphase (steady state) :** In dieser Phase bleiben die Werte

eine Weile konstant. Die Dauer dieser Phase ist von der vorhandenen GTP-Konzentration abhängig. Der Verbrauch des vorhandenen GTPs führt zur Instabilität der Mikrotubuli und zu einer leichten Extinktionsabnahme. Gibt man GTP zu, so verlängert sich die Gleichgewichtsphase. Bis vor wenigen Jahren wurde die Polymerisation, die nur in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und GTP erfolgt, mit dem einfachsten Schema (Nukleation mit anschließender Elongation) analog der Polymerisation des Aktin beschrieben (Osawa und Askura, 1975; Purisch und Kristofferson, 1984). Mitchison und Kirschner (1984) fanden aber in elektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß kurz nach Erreichen des stationären Gleichgewichts viele kurze Mikrotubuli vorhanden waren. Nach wenigen Minuten jedoch war die Anzahl der Mikrotubuli gesunken, deren mittlere Länge aber gewachsen. Horio und Hotani (1986) zeigten mit Hilfe der Videomikroskopie über eine direkte Darstellung, daß im stationären Gleichgewicht einige Mikrotubuli wachsen während andere schrumpfen. Der Anteil des in Mikrotubuli eingebauten Tubulins bleibt dabei konstant (dynamische Instabilität).

### **1.2.3 Bildung von Tubulinringen**

Tubulin bildet unter Bedingungen, unter denen keine Mikrotubulibildung möglich ist, Ringe als Speicherform aus (Kirschner, 1978). Diese Ringe, die meist als konzentrische Doppelringe vorliegen, bestehen aus gekrümmten Protofilamentstücken (Mandelkov et al., 1983) und haben einen mittleren Durchmesser von 30-45 nm (Scheele und Borisy, 1979). Ihre Bildung wird durch MAPs,  $Ca^{2+}$  (Purisch und Kristofferson, 1984), GDP (Jameson und Caplow, 1980) und durch niedrige Temperaturen (Engelborghe et al., 1977) begünstigt.

### **1.2.4 Die biologischen Funktionen der Mikrotubuli**

Mikrotubuli sind ein ubiquitärer Bestandteil eukaryontischer Zellen und spielen in vielen Bereichen der Zellbiologie eine Rolle. Als Bestandteil des Cytoskeletts sind sie Teil der formgebenden Strukturen in der Zelle. Als Komponenten von Cilien und Geißeln haben sie eine zentrale Aufgabe bei der Bewegung von Zellen. Mikrotubuli haben für den intrazellulären Transport (z.B. den axonalen Transport) die Aufgabe von Transportbahnen, entlang derer

Vesikel und Organellen mit Hilfe von Motorproteinen transportiert werden. Ihre dynamischen Eigenschaften werden weiter dazu genutzt, um Zellsignale zu übertragen. Eine wichtige Aufgabe übernehmen die Mikrotubuli bei der Mitose bzw. Meiose. Sie bilden die Hauptkomponente des Spindelapparates. Während der Zellteilung polymerisieren Tubulindimere ausgehend von den Nukleationszentren, die bei tierischen Zellen als Centrosomen in Erscheinung treten und bauen dabei die Kernspindel auf, welche die duplizierten Chromosomen auseinanderzieht. Nach erfolgter Zellteilung zerfallen die durch einen Selbstorganisationsprozeß entstandenen Spindel-Mikrotubuli wieder.

.

### **1.2.5 Tubulin/Mikrotubuli, die dynamische Instabilität**

Die Mikrotubuli sind keine statischen Strukturen, sondern dynamische Polymere. Nach einer gewissen Wachstumsperiode stellen sich an den Enden der Mikrotubuli Gleichgewichte mit ständiger Aufnahme und Abgabe von Tubulineinheiten ein. Das Wachstum erfolgt hauptsächlich durch Anlagerung von Heterodimeren. Dagegen werden bei dem Zerfall Oligomere abgegeben, die anschließend in die Dimere zerfallen. Sind Wachstum und Zerfall ausgeglichen, spricht man bezüglich des freien Tubulins von der "kritischen Konzentration". Diese kritische Konzentration ( $C_c$ ) ist demnach die Tubulinkonzentration, bei der in Lösungen definierter Ionenstärke ein Fließgleichgewicht erreicht wird. Dabei stimmt die Anzahl der anpolymerisierten Tubulindimere mit der Anzahl der in Lösung gehenden überein.

Der Gleichgewichtszustand des Tubulin/Mikrotubulsystems hat die Fähigkeit, sich schnell zu ändern. Diese Eigenschaft kann durch das Modell der "Dynamischen Instabilität" erklärt werden. Zwei Parameter beeinflussen diese Instabilität in besonderem Maße. Zum einen erfolgen alternierendes Wachstum und Schrumpfen bei Konzentrationen um den  $C_c$ -Wert. Oberhalb von  $C_c$  erfolgt die Polymerisation von Tubulin-Untereinheiten zu Mikrotubuli, und unterhalb depolymerisieren Mikrotubuli in die einzelnen Untereinheiten. Der zweite Parameter ist die Besetzung der Austausch-Bindungsstellen des  $\beta$ -Tubulins am Plusende der Mikrotubuli mit GTP oder GDP (Darnell et al., 1993). Ausgehend von dem Nachweis, daß der Tubulin-GTP-Komplex die polymerisationsaktive Tubulinform ist, ein Mikrotubulus aber nahezu ausschließlich aus GDP-Tubulin besteht (Caplow, 1992), stellt sich die Frage, wie die Energie der GTP-Hydrolyse

zur Erzeugung der dynamischen Instabilität genutzt wird. Nach diesem Modell können ausschließlich an GTP gebundene Tubulindimere an das wachsende Ende (Plusende) des Mikrotubulus addiert werden. So erhält der Mikrotubulus eine "Kappe" aus einem Tubulin-GTP-Komplex. Nur solche Mikrotubuli sind stabil, die an ihrem Tubulin endständig eine GTP-Kappe tragen (Kirschner, 1984; Darnell et al., 1993). Es wird vermutet, daß in dem Moment, in dem ein Mikrotubulus durch Hydrolyse zu Tubulin-GDP seine Kappe verliert und bevor sich neues GTP-Tubulin anheftet, ein schneller Zerfall des Mikrotubulus und von GDP-Tubulin zu GDP + Tubulin eintritt (Nicolaou et al., 1994).

### **1.2.6 Mikrotubuli und die Zellteilung**

Während der Zellteilung erfolgt zuerst eine Kernteilung (Mitose) und nachfolgend die Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese). Zu Beginn der Mitose entsteht aus dem unpolaren Cytoskelett der wachsenden Zelle die bipolare Struktur der sich teilenden Zelle. Zu Beginn der Mitose trennen sich die bereits replizierten Centriolen eines Centrosoms und bilden die beiden Spindelpole. Es kommt zur Depolymerisierung der für die Interphase typischen Mikrotubuli. Aus dem dabei freigesetzten Tubulin entstehen, ausgehend von den beiden Spindelpolen, neue Mikrotubuli, die sich teilweise mit den Kinetochoren der Chromosomen verbinden, zum anderen mit den ihnen entgegenwachsenden Mikrotubuli des gegenüberliegenden Spindelpols interagieren oder den Spindelapparat an der Zelloberfläche verankern. Gleichzeitig ordnen sich die Chromosomen zu der Metaphaseplatte an. Zweck der Spindel ist, die beiden Pole mit je einem Satz von Tochterchromosomen zu verbinden und diese zu den Zellpolen zu transportieren. Die Mikrotubuli werden dabei nicht gezielt ausgesandt, sondern orientieren sich in großer Zahl zufällig von den MTOC weg. Wenn sie dabei auf ein Kinetochor treffen, werden sie dadurch offenbar stabilisiert, während die übrigen depolymerisieren und spontan verschwinden. (Stryer, 1991). Dieses Beispiel zeigt, wie die Zellen sich das dynamische Verhalten der Mikrotubuli zunutze machen.

## **1.3 Antimitotische Wirkstoffe**

### **1.3.1 Allgemein**

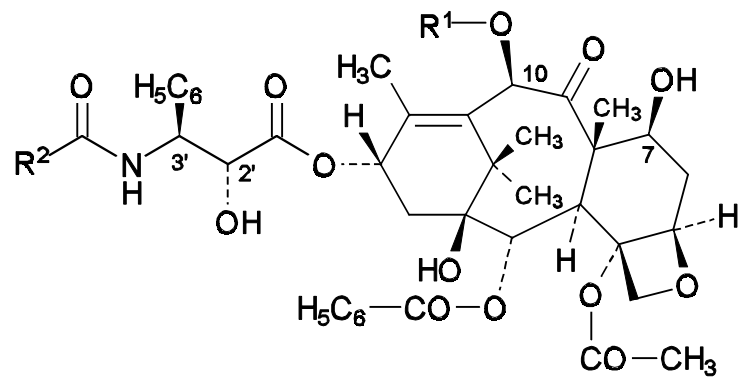
Eine Reihe von Faktoren beeinflussen die Polymerisation der Mikrotubuli *in vitro*. So fördern GTP, MAPs,  $Mg^{2+}$ -Ionen, organische Säuren, Reagenzien wie Glycerin, Glutamat, Saccharose, Sulfonat und DMSO und Temperaturen zwischen 26 und 37 °C die Polymerisation, ebenso die Wirkstoffe Paclitaxel (Taxol) und Epothilon. Polymerisationshemmend wirken dagegen GDP,  $Ca^{2+}$ -Ionen, niedrige Temperaturen (zwischen 0 und 10 °C), Zentrifugation bei hohen Geschwindigkeiten und antimitotische Wirkstoffe wie Colchicin, Vinca-Alkaloide (Vinblastin und Vincristin), Podophyllotoxin, Phomopsin A und Dolastatin.

### **1.3.2 Taxol und Taxotere**

Die molekulare Pharmakologie des Taxols (Abb. 1.1) wurde von Horwitz et al. (1979) untersucht. Die Forscher stellten fest, daß Taxol reversibel an Tubulin bzw. Mikrotubuli bindet und das Tubulin/Mikrotubuli-Gleichgewicht beeinflusst. Die Bindung zwischen Taxol und Tubulin ist sehr stark, und zwar stärker an die intakten Mikrotubuli als an das freie Tubulindimer. Die Bindungsstelle von Taxol liegt auf der  $\beta$ -Untereinheit (Carboni et al., 1993). Unter Umständen besteht eine gewisse räumlich Überlappung mit der Colchicinbindungsstelle (Howard und Timasheff, 1988).

Taxol setzt einerseits die kritische Konzentrationen von Tubulin herab und verkürzt andererseits die Induktionszeit für die Polymerisation, wirkt also Polymerisation-induzierend. Außerdem induziert Taxol die Polymerisation in Abwesenheit von GTP, MAPs und in der Kälte (4 °C). Bei niedrigen Temperaturen sind allerdings GTP oder MAPs notwendig. Die durch Taxol induzierten Mikrotubuli sind stabil in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen. Außerdem stabilisiert Taxol die Mikrotubuli in Gegenwart von Colchicin oder Vinblastin. Die stabilisierende Wirkung von Taxol ist demnach in der Lage, die destabilisierenden Wirkungen von Colchicin und Vinblastin auszuschalten (Howard und Timasheff, 1988). *In vivo* zeigen Taxol und das verwandte Taxotere cytostatische Aktivität. Taxol verursacht die Aggregation eines großen Teils des freien Tubulins

und wirkt während aller Phasen des Zellzyklus. Es stoppt die Mitose, löst eine Apoptose aus und führt zu sternförmigen Mikrotubuli-Anordnungen, die nicht von MTOCs ausgehen.

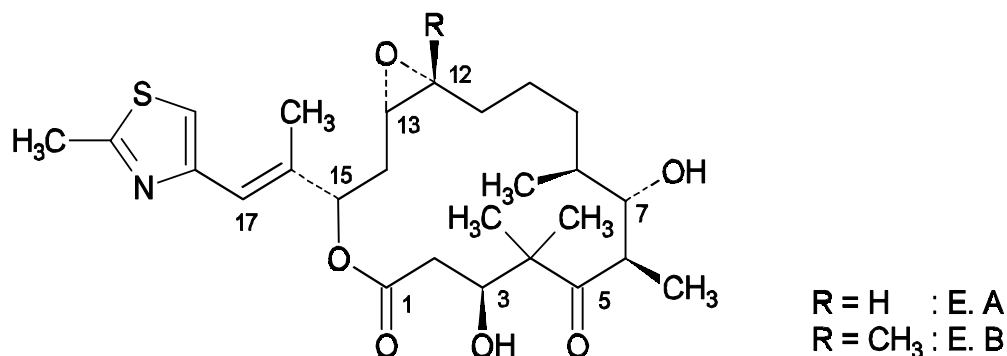


$R^1 = \text{CO}-\text{CH}_3$  ,  $R^2 = \text{C}_6\text{H}_5 = \text{Taxol}$   
 $R^1 = \text{H}$  ,  $R^2 = \text{OC}(\text{CH}_3)_3 = \text{Taxotère}$

**Abb. 1.1 Die chemische Struktur von Taxol und Taxotere**

### 1.3.3 Epothilon aus Myxobakterien

Epothilon (Abb. 1.2) wurde aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert, (Höfle et al., 1993; Gerth et al., 1996; Höfle et al., 1996). Bollag et al. (1995) erkannten die antimitotische Aktivität der Epothilone A und B. Die Epothilone haben den gleichen Wirkungsmechanismus wie Taxol, sind jedoch stärker wirksam, besonders auch gegen taxolresistente Tumorzellen.



**Abb. 1.2 Die chemische Struktur von Epothilon A und B**

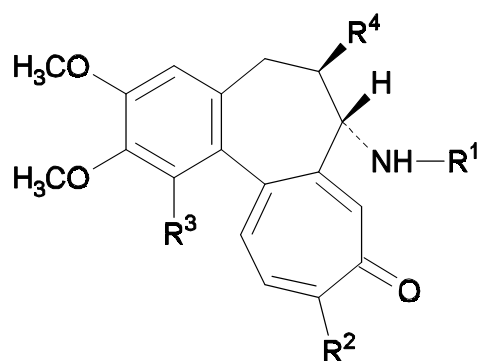
### 1.3.4 Colchicin

Das Alkaloid Colchicin (Abb.1.3) aus *Colchicum autumnale* wurde jahrhundertlang zur Behandlung akuter Gichtanfälle eingesetzt, die durch einen erhöhten Harnsäurespiegel in den Körperflüssigkeiten hervorgerufen werden, da es die von Mikrotubuli abhängigen sekretorischen Prozesse blockiert (Stryer, 1988). Außerdem verlangsamt Colchicin vermutlich die amöboiden Bewegungen der weißen Blutzellen, weil es ihre Mikrotubuli-Systeme hemmt (Voet und Voet, 1994). Colchicin führte zur Entdeckung von Tubulin und den ersten Einblicken in dessen biologische Funktionen. Es ist bekannt, daß Colchicin sehr fest an Tubulin bindet und zwei Bindungsmechanismen für die substöchiometrische Bindung hat; einen für die direkte Bindung zwischen Colchicin und dem Mikrotubulusende und einen zweiten für die Bindung zwischen Tubulin-Colchicin-Komplex und dem Mikrotubulusende, wodurch die Anheftung weiterer Tubulindimere verhindert wird (Margolis und Wilson, 1977, Margolis et al., 1980). Die Bindung von Colchicin an Tubulin ist relativ langsam (Dustin, 1984), weswegen eine relativ lange Inkubationszeit nötig ist. Es wurde festgestellt, daß Colchicin *in vitro* die Verlängerung der Mikrotubuli blockiert, aber auch eine Depolymerisation der Mikrotubuli beschleunigt. Colchicin fördert die GTP-Hydrolyse am Tubulin.

Die durch Colchicin gehemmte Tubulinanlagerung bzw. Mikrotubuliverlängerung führt zu einem Verlust an Mikrotubuli durch Störung des Fließgleichgewichts (Darnell et al., 1994).



Verschiedene Funktionen der Mikrotubuli beruhen darauf, daß diese Filamente rerversibel wachsen und schrumpfen können (s. auch unter 1.2.5.). Durch Hemmung der Polymerisation stört Colchicin alle Zellvorgänge, die von funktionsfähigen Mikrotubuli abhängen. In Gegenwart von Colchicin bilden sich keine Mitosespindeln, so daß die Chromosomen nicht zu den Zellpolen wandern können. Daher wird Colchicin dazu verwendet, um bei cytogenetischen Untersuchungen große Mengen an Metaphasezellen für die Chromosomenanalyse zu gewinnen. Colchicin hemmt auch den Transport von Vesikeln an den Mikrotubuli; es blockiert daher viele sekretorische Prozesse. Colchicin spielt weiter eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von Wirkmechanismen anderer antimitotischer Stoffe und bei der Erforschung der Funktionen der Mikrotubuli.



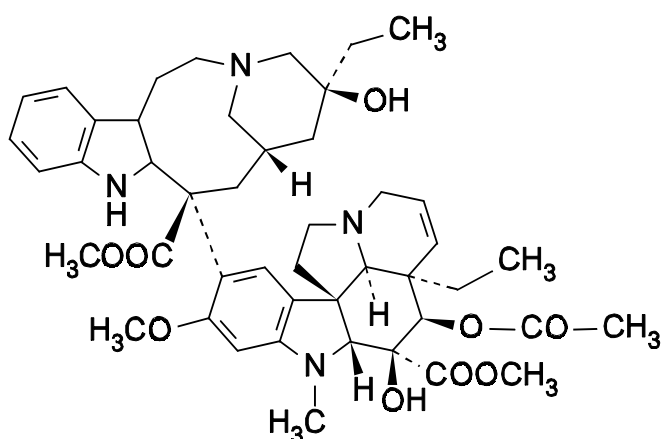
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	
COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	Colchicin
CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	Colchamin (Demecolcin)
COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OGlc	H	Colchicosid
COCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	Colchicein
COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	Colchicillin
CO—CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	Colchifolin

Abb.1.3 Die chemische Struktur von Colchicin und Colchicin-Derivaten

### 1.3.5 Vinblastin

Eine zweite bedeutende antimitotische Wirkstoffgruppe sind die aus den Blättern von *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*) gewonnenen Vinca-Alkaloide Vinblastin und Vincristin. *Vinca rosea*

ist eine in Madagaskar heimische Immergrünpflanze. Vinblastin und Vincristin können auch semisynthetisch aus der natürlichen Vorstufe Catharanthin gewonnen werden (Brade und Niemeyer, 1987). Obwohl sie schon seit drei Jahrzehnten in der Chemotherapie eingesetzt werden, ist der genaue Wirkungsmechanismus der Vinca-Alkaloide noch nicht aufgeklärt. Auf jeden Fall blockieren sie die Polymerisation von Tubulin. Neben einer Polymerisationshemmung verursachen Vinca-Alkaloide in superstöchiometrischen Konzentrationen ungewöhnliche Polymerisationen, die zu losen spiralförmigen Mikrotubuli sowie kristallinen Strukturen führen. Vinblastin (Abb. 1.4) besitzt eine Bindungsstelle am Tubulin, die sich räumlich von der Colchicin-Bindungsstelle unterscheidet und deren Lage am Tubulin bis heute unbekannt ist. Vinca-Alkaloide stabilisieren die Bindung von Colchicin an Tubulin. Vinblastin-Sulfat wird hauptsächlich gegen systemische Tumoren eingesetzt, während Vincristin-Sulfat gegen solide Tumoren verabreicht wird (Brade und Niemeyer, 1987).



**Abb. 1.4 Die chemische Struktur von Vinblastin**

### 1.3.6 Phomopsin A

Der dritte antimitotische Wirkstoff ist das aus dem Pilz *Phomopsis leptostomiformis* isolierte Phomopsin A (Abb. 1.5). Dieser Pilz wächst auf Lupinen und produziert ein giftiges Sekret, das

für Vergiftungen bei Viehbeständen, die Lupinose, verantwortlich ist. Der dafür verantwortliche Stoff im Sekret ist das Hexapeptid Phomopsin A, das *in vivo* und *in vitro* die Tubulinpolymerisation hemmt. Außerdem induziert Phomopsin A eine Tubulin-Aggregation und konkurriert nicht-kompetitiv mit Vinblastin sowie kompetitiv mit Dolastatin 10 um Tubulin-Bindungsstellen.

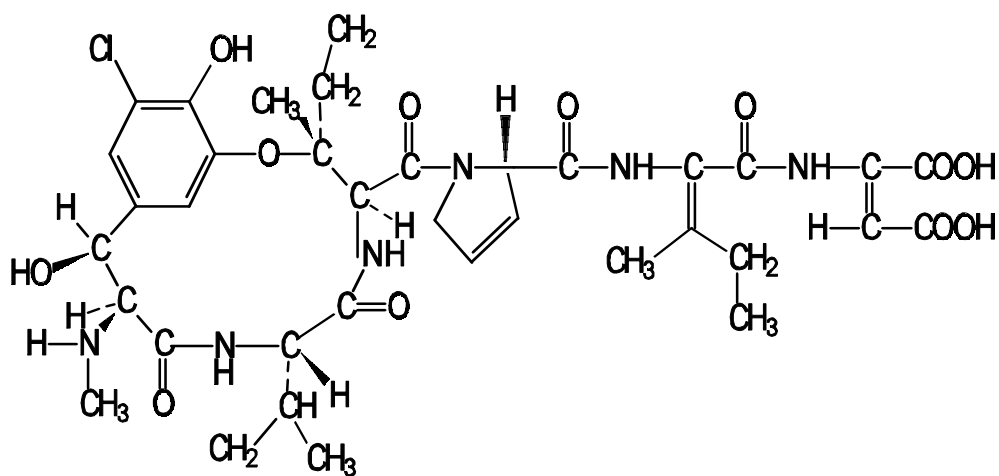
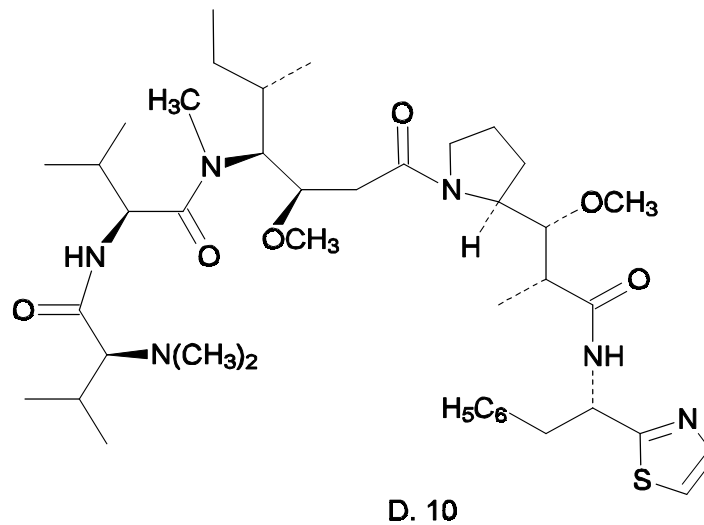


Abb.1.5

Die chemische Struktur von Phomopsin A

### 1.3.7 Dolastatin

Im Jahre 1979 isolierten Pettit und seine Mitarbeiter aus 100 kg Material der Meeresschnecke *Dolabella auricularia* ca. 1 mg Dolastatin 3. 1982 veröffentlichte Pettit einen Strukturvorschlag und berichtete über eine erhebliche cancerostatische Wirkung gegenüber Leukämiezellen P-388. Danach wurden insgesamt neun verschiedene Dolastatine aus Mollusken des Indischen Ozeans extrahiert, die das Wachstum von Zellen und Tumoren verhinderten. Dolastatin 10 (Abb. 1.6) führt in den Zellen zum Verschwinden der Mikrotubuli, verhindert deren Polymerisation *in vitro* und blockiert die Zellteilung, (Pettit et al., 1987; Bai et al., 1990).



**Abb.1.6 Die chemische Struktur von Dolastatin 10**

## 1.4 Myxobakterien

Myxobakterien sind Gram-negative, einzellige Bakterien, die über die Fähigkeit zu gleitender Bewegung an Phasengrenzflächen verfügen. Sie sind weltweit verbreitet und finden sich vor allem im Boden, auf Baumrinde, verrottetem Holz und Dung. Sie ernähren sich von unlöslichen organischen Molekülen, die sich durch Ausscheidung von Abbau-Enzymen zerlegen. Sie bleiben in lockeren Kolonien zusammen, in denen die von den einzelnen Zellen sezernierten Verdauungsenzyme gesammelt werden, wodurch der Nutzeffekt der Nährstoffversorgung steigt. Es sind relativ lange Stäbchen von 3-6 µm, die einen Durchmesser von 0,7 bis 1,0 µm haben. Myxobakterien fallen besonders durch die Fähigkeit zur Bildung von Fruchtkörpern und Myxosporen auf, welche es ihnen ermöglichen, Trockenheit oder Nährstoffmangel zu überstehen (Reichenbach, 1984; Reichenbach und Dworkin, 1992). Systematisch gehören die Myxobakterien zu einer eigenen Ordnung, die in zwei Unterordnungen, die Cystobacterineae und die Sorangineae unterteilt wird. Die Unterordnung Cystobacterineae enthält 7 Gattungen, davon sind am bekanntesten Myxococcus, Coralloccoccus, Stigmatella und Cystobacter. Die Unterordnung Sorangineae umfaßt insgesamt 5 Gattungen, unter anderm Sorangium, Polyangium und

Chondromyces.

Myxobakterien produzieren eine große Anzahl interessanter Sekundärmetabolite, von denen viele eine antibiotische Wirkung haben. In den Abteilungen Naturstoffbiologie und Naturstoffchemie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) wurden in den letzten 20 Jahren über 6000 Myxobakterienstämme einem Screening nach neuen biologisch aktiven Verbindungen unterzogen. Seit 1975 wurden rund 80 neue Grundstrukturen biologisch aktiver Substanzen mit mehr als 350 Varianten gefunden. Die Wirkstoffe aus den Myxobakterien gehören zu sehr unterschiedlichen Substanzklassen. Das Wirkungsspektrum umfaßt Gram-positive, Gram-negative Bakterien, Hefe und Pilze und höhere Zellen. In den letzten Jahren wurden vermehrt Verbindungen mit Wirkung auf das Cytoskelett tierischer Zellen gefunden.

#### **1.4.1 Cytostatika aus Myxobakterien**

Zellwachstum und Zellvermehrung sind durch ein außerordentlich genau reguliertes System gesteuert. Gelegentlich versagt dieses System, so daß sich Zellen vergrößern und teilen, obwohl für den Körper kein Bedarf besteht. Wenn die Nachkommen dieser Zellen diese Eigenschaft vererben und unreguliert weiterwachsen, entsteht daraus ein Klon von unerwünschter Zellmasse, der als Tumor bezeichnet wird. Für die Chemotherapie solcher Tumore steht heute eine Palette von verschiedenartigen Substanzen zur Verfügung (Cytostatika, wie Antihormone, Mitosespindelgifte und andere). Ein großer Teil der heute verwendeten Wirkstoffe stammt direkt oder auf dem Umweg über eine chemische Synthese aus Mikroorganismen und Pflanzen.

Interessanterweise produzieren Myxobakterien eine Serie von Cytostatika, die sich gegen das Cytoskelett eukaryotischer Zellen richten. So wirken Chondramid (aus *Chondromyces crocatus*) und Rhizopodin (aus *Myxococcus stipitatus*) auf die Aktin-Mikrofilamente des Cytoskelett. Sie blockieren *in vitro* die Polymerisation von G-Aktin (Sasse et al., 1998; Gronewold et al., 1999). Vertreter einer zweiten Gruppe von Cytostatika, die auf das Tubulin/Mikrotubuli System wirken, sind das bereits erwähnte Epothilon und das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Tubulysin.



etabliert, mit denen der Einfluß von Wirkstoffen auf die Ausbildung von Mikrotubuli quantifiziert werden kann. Bindungsstudien, elektronenmikroskopische Untersuchungen und Messungen sollten den Wirkungsmechanismus von Tubulysin weiter aufklären helfen.

Ferner wurde die Wirkung der neuen Verbindung auch *in vivo* näher charakterisiert, vor allem auf eine Korrelation zwischen der Mikrotubulizerstörung und einem Apoptoseeffekt hin. Alle Untersuchungen wurden soweit möglich im Vergleich mit bekannten antimitotischen Substanzen durchgeführt.

## **2. Material und Methoden**

Es gilt für alle Versuchsergebnisse: die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen.

### **2.1 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Aldrich (Steinheim), Boehringer-Mannheim (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Biometra (Göttingen) bezogen.

### **2.2 Puffer**

#### **Phosphat-gepufferte Salzlösungen**

Die Zusammensetzung der verwendeten Salzlösungen nach Earle (EBS) und Dulbecco (PBS) kann Tabelle 2.1 entnommen werden.



**Tab. 2.1 Die Zusammensetzung von EBS (Earles physiologische Salzlösung) und PBS (Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung)**

Substanz	EBS [g/l]	PBS [g/l]
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	-	0,133
D-Glucose	1,0	-
KCl	0,4	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,2
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	-	0,1
NaCl	6,8	8,0
NaHCO <sub>3</sub>	2,2	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,158	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	1,15
Phenolrot (Merck)	0,017	-

#### **MES-Puffer; pH 6,5:**

0,1 M MES (2-Morpholino-ethansulfonsäure)/NaOH, pH 6,8

0,5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure)

0,1 mM EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure)

1 M DTT (1,4-Dithio-L-threitol)

#### **PEM-Polymerisationspuffer; pH 6,6:**

0,1 M PIPES (Piperazin-bis-1,4-(2-ethansulfonsäure))

1 mM EGTA

1 mM MgSO<sub>4</sub>

1 mM GTP

## **2.3. Geräte**

### **Photometer:**

- Unicam-UV-1 Spektrophotometer
- Beckmann UV-DU 7500 Spektrophotometer
- Titertek Multiscan MCC/340 der Fa. ICN
- Victor Multilabel Counter der Fa. Wallac

### **Zentrifugen:**

- Hettich-Universal/K25
- Combi Sorvall Zentrifuge OTD-Combi
- DuPont-Instruments, Sorvall-RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge
- Eppendorf Zentrifuge 5402

### **Homogenisator und Mixer:**

- Mixer Modell Rotor GT 800, Fa. Rotor AG, Uetendorf (Schweiz)
- Teflon-in-Glas-Homogenisatoren mit Rotationstrieb, Fa. Braun

### **Zellkulturtechnik:**

- CO<sub>2</sub>-Inkubator, Modell Auto-Zero, Fa. Heraeus

### **FPLC-System:**

- Pharmacia LKB Pumpe P-500
- Pharmacia LKB Fraktionssammler FRAC-200
- Pharmacia LKB XY-Schreiber REG102

### **Flüssigkeitsszintillationszähler:**

- Beckman LS 6500 (Multi-purpose Scintillation Counter)

## **2.4 Zelllinien und Kulturmedien**

### **2.4.1 PtK<sub>2</sub> (NBL-5, ATCC CCL 56)**

Diese Zelllinie wurde von der Niere einer männlichen Australischen Beutelratte (*Potorous tridactylis*) angelegt. Die epithelähnlichen Zellen wachsen adhärent und sind sehr flach.

### **2.4.2 L929 (NCTC Klon 929, ATCC CCL1)**

L929 ist der Klon 929 eines Stammes L, der von Bindegewebszellen einer männlichen C3H/An-Maus angelegt wurde. Der Stamm L ist einer der ersten, der in kontinuierlicher Kultur gehalten werden konnte, und eine sehr häufig verwendete Zellkultur für die Untersuchung der Karzinogenese *in vitro*. Die Zellen wachsen adhärent und haben das Aussehen von Fibroblasten.

### **2.4.3 K-562 (ATCC CCL 243)**

Die kontinuierliche Zelllinie K-562 wurde aus einer pleuralen Effusion einer Frau mit chronischer myelogener Leukämie gestartet. Die Zellen wachsen in Suspension.

### **2.4.4 HL-60 (ATCC CCL 240)**

HL-60 ist eine promyelocytische Zelllinie, die aus peripheren Blut-Leukocyten einer Frau mit akuter promyelocytischer Leukämie angelegt wurde. Die Zellen wachsen ebenfalls in Suspension.

### **2.4.5 U-937 (DSM ACC 5)**

Als dritte Suspensions-Zelllinie wurde U-937 verwendet. Sie stammt aus einer pleuralen Effusion eines Mannes mit einem histiocytischen Lymphom.

#### **2.4.6 KB-3.1 (DSM ACC 158)**

KB-3.1-3.1 ist ein Derivat der HeLa-Zelllinie, die von einem primären Cervix-Karzinom etabliert wurde. Die Zellen wachsen adhärent.

### **2.5 Allgemeines zur Zellkultivierung**

Alle Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10 % und einer Luftfeuchtigkeit von über 95% gehalten. Die Kulturen wurden wöchentlich subkultiviert. Adhärent wachsende Zellen wurden dazu abgeschabt (Zellschaber der Fa. Nunc) oder durch Behandlung mit 0,25 % Trypsin (GibcoBRL) abgelöst. Die Zellkulturen wurden mit einem Invers-Mikroskop (Axiovert 35 der Fa. Zeiss) kontrolliert. Über eine Videokamera (AVT-BC1 der Fa. Horn, Aalen) konnte das kontrastverstärkte mikroskopische Bild auch über einen Monitor (Panasonic WV-5470) betrachtet werden.

**Tab. 2.2** Eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien und deren Kulturmedien.

Die Medienbestandteile stammen von der Fa. GibcoBRL; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium mit L- Glutamin, MEM: Minimal Essential Medium mit Earles Salzen und L-Glutamin

Zellkultur Medium	Supplemente/Liter	Verdünnung bei Subkultivierung
<b>PtK<sub>2</sub></b> MEM-Fertigmedium	1 % (w/v) L-Glutamin, 10 % FCS 1 % (w/v) nicht-essentielle Aminosäure	1: 10
<b>L-929</b> DMEM-Fertigmedium	3,7 g NaHCO <sub>3</sub> 10 % (w/v) NCS <sup>1</sup>	1: 20
<b>KB-3.1</b> DMEM-Fertigmedium	2 g NaHCO <sub>3</sub> 10 % (w/v) NCS <sup>1</sup>	1: 20
<b>K-562</b> RPMI-1640- Fertigmedium	3,7 g NaHCO <sub>3</sub> 10 % (w/v) NCS <sup>1</sup>	1: 10
<b>HL-60</b> RPMI-1640- Fertigmedium	3,7 g NaHCO <sub>3</sub> 10 % (w/v) NCS <sup>1</sup>	1: 10
<b>U-937</b> RPMI 1640- Fertigmedium	3,7 g NaHCO <sub>3</sub> 10 % (w/v) NCS <sup>1</sup>	1: 10

<sup>1</sup> Newborn Calf Serum

**Tab. 2.3      Übersicht über die verwendeten Kulturgefäße und Medienvolumina**

Typ	Größe	Volumen des Mediums
Polystyrol-Gewebekulturflaschen der Firma Greiner	50 ml-Flaschen steril	10 ml
Polystyrol-Gewebekulturflaschen der Firma Greiner	600 ml-Flaschen steril	70 ml
Zellkulturmikroplatten der Firmen Falcon und Nunc	96-well steril	je 120-200 µl
Zellkulturplatten der Firmen Falcon und Nunc	24-well steril	je 750 µl
Zellkulturplatten der Firmen Falcon und Nunc	6-well steril	je 750 µl
Zellkulturplatten der Firmen Falcon und Nunc	4-well steril	je 750 µl

## 2.6      Einfrieren und Auftauen von Zellen

Kurz vor der Konfluenz stehende Zellen wurden trypsinisiert und in Einfriermedium (Kulturmedium der Zelllinie mit 5 % FCS (Foetal calf serum) und 10 % DMSO) aufgenommen. Jeweils 1 ml der Suspension mit ca.  $10^6$  Zellen wurden in sterile Kryoröhrchen abgefüllt, eine Stunde auf Eis gelegt und dann in einer Einfrierbox in einer Tiefst Kühltruhe über Nacht auf -70 °C abgekühlt. Danach wurden die Konserven in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen 30 min auf Eis gelegt und dann im Wasserbad bei 37 °C vollständig aufgetaut. Der Inhalt der Röhrchen wurde mit 10 ml Medium versetzt und bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 10 ml Medium resuspendiert.

## **2.7 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellen wurden in einer Zählkammer nach Neubauer (Fa. Brand), Kammertiefe 0,1 mm, gezählt.

## **2.8 *In-vivo* Untersuchungen**

### **2.8.1 Romanowsky-Giemsa-Färbung**

Zur besseren Darstellung der Morphologie wurden die Zellen nach Romanowsky-Giesma angefärbt. Die Färbung beruht auf der Wirkung von kationischem blauem Azur B und rot-orangefarbenem Eosin Y. Vor allem die DNA färbt sich purpurn.

**Fixierlösung:** Azur B-Eosin Stammlösung (Serva) wurde mit Methanol 1: 15 verdünnt.

**Farblösung:** Azur B-Eosin Stammlösung wurde mit HEPES-Puffer (Roth, pH 6,5) 1: 50 verdünnt.

Die L929-Zellen wurden in Objektträgern mit 4 Kammern (Nunc) angezogen. Zum Färben wurde das Medium abgesaugt, tropfenweise Fixierlösung zugegeben und für 2 min fixiert. Danach wurde die Fixierlösung gegen Färbelösung ausgetauscht. Die Färbezeit betrug zwischen 2 und 4 min. Zum Schluß wurden die Objektträger einmal mit HEPES-Puffer und einmal mit Wasser gespült. Die Kammern wurden von den Objektträgern abgezogen und die Präparate an der Luft getrocknet.

### **2.8.2 Vitalitätstest**

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem Lipasesubstrat, Fluoresceindiacetat (Sigma) bestimmt (Widholm, 1972). Den Zellkulturen (10 ml) wurde ein Tropfen einer frisch hergestellten 2%igen

Fluoresceindiacetatlösung zugegeben. Die Lösung ist nur einige Stunden haltbar. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min konnten die vitalen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop durch ihre kräftig grüne Fluoreszenz erkannt werden.

### **2.8.3 MTT-Test**

Der MTT-Test ist eine einfache und häufig verwendete Methode zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen. MTT ist die Abkürzung von [3-(4,5-Dimethylthiazol)-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Die Verbindung wird mit NADH in einer durch Dehydrogenasen katalysierten Reaktion zum unlöslichen Formazan reduziert. Dieses wird im Test in Isopropanol gelöst und die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Die Höhe der Meßwerte ist dabei proportional der Zellzahl und der Stoffwechselaktivität dieser Zellen (Mosmann, 1983; Green et al., 1984; Denizot und Lange, 1986).

Für den Test wurden Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen angezogen. Zum Meßzeitpunkt wurden die Zellen für 2 h mit 0.5 mg/ml MTT (Sigma) inkubiert, danach abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, und das gebildete Formazan in 100 µl 0,4 N HCl in Isopropanol gelöst. Die Platten wurden nach 10 min mit einem Titertek Multiscan Photometer bei 595 nm vermessen.

### **2.8.4 Immunfluoreszenzmikroskopie**

#### **2.8.4.1 Zellenvorbereitung**

PtK2- Zellen wurden auf runden Deckgläschen in 4-well-Platten angezogen. Das Inokulum betrug 500.000 Zellen /ml. Nach 48 bis 72 Stunden wurden den Zellen unterschiedliche (10 bis 50 ng/ ml) Konzentrationen von Tubulysin A zugesetzt. Die Inkubationszeiten betrugen 0, 4, 8, 16, 24, 36, 48 und 72 Stunden. Danach wurden die Zellen kurz mit PBS gespült, 10 min bei Raumtemperatur mit 4% Formalin fixiert, erneut mit PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert (Einwirkzeit 10 min). Zum Schluß wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit den verschiedenen



Antikörpern und Färbesubstanzen inkubiert. Dabei wurden jeweils 200 µl pro Deckglas eingesetzt.

#### **2.8.4.2 Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli**

Die Mikrotubuli wurden durch Immunfluoreszenzfärbung mit zwei Antikörpern dargestellt. Als Primärantikörper wurde Anti- $\alpha$ -Tubulin-Immunglobulin der Maus (Sigma) eingesetzt. Der monoklonale Antikörper der Firma Sigma wurde 1 : 500 verdünnt zugesetzt und 1 Std lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde gegen Maus-IgG gerichtetes Immunglobulin einer Ziege benutzt. Der verwendete polyklonale Antikörper von Sigma wurde 1 : 50 verdünnt und mit dem Präparat ebenfalls für 1Std. bei 37 °C inkubiert. Dieser Antikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat (TRITC) gekoppelt. Dieser leuchtet im UV-Licht bei 340 nm rot auf.

#### **2.8.4.3 Färbung der Zellkerne**

Um die Zellkerne darzustellen, wurde in einer Doppelfärbung den Zellen zusammen mit der polyklonalen Antikörperlösung DAPI (4',6 -Diamidino-2-phenylindol) in einer Konzentration von 1 µg/ml PBS-Puffer zugegeben. Die angefärbte DNA läßt die Zellkerne hellblau leuchten.

#### **2.8.4.4 Färbung von Actin-Filamenten**

Für eine Doppelfärbung von Mikrotubuli und Actin-Mikrofilamenten wurden die Zellen nach dem Auswaschen des Sekundärantikörpers für 30 min bei 37°C mit Phalloidin-fluoresceinisothiocyanat (FITC) inkubiert (1 µg/ml). Phalloidin-FITC bindet spezifisch an F-Actin und fluoresziert grün.

#### **2.8.4.5 Einbettung**

Nach Abschluß der Färbung wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und aus den

Kulturplatten entnommen. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt. Dann wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten mit 3 µl Vectashield (Vector) auf einem Objektträger befestigt. Die Präparate wurden mit farblosem Nagellack versiegelt und im Kühlschrank aufbewahrt.

#### **2.8.4.6 Mikroskopie und Photodokumentation**

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Axiophot Mikroskops (Zeiss) mit Standard-Epifluoreszenzfiltersätzen für Rhodamin, FITC und DAPI betrachtet. Das Mikroskop war mit Neofluar-Objektiven (40x; 63x; 100x) ausgestattet und besaß eine Photoeinrichtung. Die Präparate wurden auf einem Farbdiaapositivfilm (Fujichrome Sensia II 400) dokumentiert, der forciert (800 ASA) entwickelt wurde. Für Schwarzweißaufnahmen wurde ein Ilford 400 Delta verwendet.

#### **2.8.5 Immuncytofluorometrie**

Mit Hilfe eines Fluorometers war es möglich, die Wirkung des Tubulysins auf die Mikrotubuli zu quantifizieren. Die Zellen wurden dazu in Mikrotiterplatten angezogen und mit Tubulysin behandelt. Zum Meßzeitpunkt wurden sie dann wie für die Fluoreszenzmikroskopie fixiert und angefärbt. Die Menge des markierten Tubulins wurde mit einem Millipore Cytofluor<sup>TM</sup> 2350 mit der Filterkombination C/D (Anregung 530 nm/Emission 620 nm) und der Empfindlichkeitsstufe 5 oder 6 bestimmt.

#### **2.8.6 Zellzyklusuntersuchungen**

Der Zellzyklus wurde mit einem Durchflußcytometer untersucht. Dafür konnten Suspensionszellen (HL-60) und gut ablösbare adhärente Zellen (L929, KB 3.1) verwendet werden (Taylor, 1980; Zong et al., 1994). Das Stadium jeder Zelle im Zellzyklus wurde über die Messung des Gehaltes an DNA bestimmt, die mit Propidiumjodid (Sigma) markiert wurde.

**Stammlösungen und Puffer:****Tris/MgCl<sub>2</sub>**

10 mM Tris + 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0

**Propidiumjodid**

Eine Stammlösung von Propidiumjodid (2 mg/ml) wurde kurz vor Versuchsbeginn auf 20 µg/ml mit Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer verdünnt.

**RNase**

Eine Lösung von 50 mg/ml RNase (Boehringer-Mannheim) wurde zu 25 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

**Durchführung des Versuchs:**

Ungefähr 10<sup>6</sup> Zellen wurden bei 1000 x g abzentrifugiert und mit 1 ml kaltem 80 %igem (v/v) Methanol fixiert. Das Methanol wurde dazu tropfenweise und unter Schütteln dem Zellpellet zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen zweimal mit s-PBS (PBS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Nach diesem Schritt konnten die Zellen für zwei oder drei Tage bei +4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Vor der Färbung wurden die Zellen mit 0,1 % Saponinlösung in s-PBS(w/v) gewaschen und abzentrifugiert. Sie wurden dann mit 0,5 ml Propidiumjodid-Lösung und 10 µl RNase-Lösung (1 mg/ml) vermischt und bei 37°C für 30 min inkubiert.

Die Messung des eingebauten Propidiumjodids erfolgte mit einem CellFit FacScan-Gerät (Becton Dickinson Immunocytometry System). Der Anregungsfilter hatte eine zentrale Wellenlänge von 360 nm bei einer Bandbreite von ±20 nm, der Emissionsfilter eine zentrale Wellenlänge von 460 nm bei gleicher Bandbreite.

**2.8.7 Zellsynchronisation**

Das Wachstum der Zellen konnte durch Zugabe von Colcemid (Demecolcine, Sigma)

synchronisiert werden. Durch seine Wirkung auf den Spindelapparat hält Colcemid die Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase fest. Dazu wurden 48 Stunden alte Zellen mit 0,3 µg/ml Colcemid über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach Auswaschen des Colcemids konnten die jetzt synchronisierten Zellen für die Untersuchungen verwendet werden.

Ein weitere Möglichkeit Zellen zu synchronisieren ist der Entzug von Serum. Dazu wurden die Zellen für drei Tage im entsprechenden Wachstumsmedium ohne Serum gehalten.

### 2.8.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden nach der Vorbereitung (2.8.9.1) der Präparate in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf und Frau Elke Hase (Abteilung Mikrobiologie, GBF Braunschweig) durchgeführt.

**Tab. 2.4      Zusammensetzung der Wasch- und Fixierpuffer für die TEM**

Substanz	Fixierpuffer-1	Waschpuffer	Fixierpuffer-2
5,5-Diethylbarbitursäure, Na-Salz	30 mM	30 mM	30 mM
Natriumacetat-trihydrat, pH 7,2	30 mM	30 mM	30 mM
Saccharose	5 % (v/v)	5 % (w/v)	5 % (w/v)
Glutardialdehyd	2,5 % (w/v)	-	-
Osmiumtetroxid	-	-	1 % (w/v)

#### 2.8.8.1 Zellvorbereitung und Fixierung

PtK<sub>2</sub>-Zellen wurden für 48 Stunden auf Permanox®-Achtammer-Objektträgern angezogen und dann für 8-48 Stunden mit verschiedenen Tubulysinkonzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden danach durch Zugabe von Fixierpuffer-1 fixiert und nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 4 °C mit Waschpuffer zweimal kurz gewaschen. Für die anschließende Kontrastierung (eine

zweite Fixierung) wurden die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur mit Fixierpuffer-2 behandelt.

### **2.8.8.2 Entwässerung, Einbettung und Polymerisation**

Die Zellen wurden in einer aufsteigenden Aceton-Reihe bei Raumtemperatur entwässert (10 % Aceton: 15 min; 10 %: 20 min; 30 %: 20 min; 50 %: 30 min; 60 %: 30 min; 90 %: 30 min; 100 %: 15 min) und für 90 min bei Raumtemperatur in einem Aceton-Epoxidharz\*-Gemisch inkubiert. Danach wurde das Aceton-Kunstharz Gemisch abgesaugt, durch frisches ersetzt und das Präparat weiter über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Aceton-Kunstharz-Gemisch nochmal gegen frisches ausgetauscht und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Spurr, 1969). Anschließend wurden die Proben abgesaugt, in Gelatine-Kapseln übertragen und mit frischem Kunstharz-Gemisch (halbvoll) aufgefüllt. Die gefüllten offenen Kapseln wurden mit Hilfe einer Rotationsvakuumpumpe entgast und dann für 8 Stunden bei 70 °C im Trockenschrank gelagert, um sie auspolymerisieren zu lassen.

\* Kunstharz-Komponenten (nach SPURR):

15 g ERL 4206 (Vinylcyclohexendioxid) Kettenstarter

12 g DER 732 (Polyglycoll-Diepoxid) Flexibilisator

39 g NSA (Nonenylbernsteinsäuranhydrid) Härter

0,6 g S1 (2-Dimethylaminoethanol) Katalysator

Bedarf pro Probe ca. 4,5 ml Kunstharz-Gemisch

### **2.8.8.3 Ultramikrotomie und Doppelkontrastierungen**

Mit einem Ultramikrotom TM 60 (Reichert) angefertigte, 120 nm dicke Ultradünnschnitte wurden mit Trägernetzchen aufgenommen und in 4% (w/v) Uranylacetat für 10 min und anschließend mit 0,3% (w/v) Bleicitrat-Lösung für 5 min nachkontrastiert (Reynolds, 1963). Die Präparate wurden schließlich in einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, CEM 902)

untersucht.

## **2.8.9 Apoptose-Bestimmungen**

### **2.8.9.1 Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente**

Mit einem photometrischen ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) der Firma Boehringer-Mannheim (Kat.-Nr.1 774 425) wurde das Auftreten Histon-assoziiierter DNA-Fragmente (Mono- und Oligonucleosomen) nachgewiesen und quantifiziert, die nach einer Apoptoseinduktion auftreten.

#### **Inhalt des Bestimmungskits:**

- 1) monoklonale Anti-Histon-Antikörper der Maus, mit Biotin konjugiert,
- 2) monoklonale Anti-DNA-Antikörper der Maus, mit Peroxidase (POD) konjugiert,
- 3) DNA-Histon Komplex als positive Kontrolle,
- 4) Inkubationspuffer\*,
- 5) Lysepuffer\*,
- 6) POD-Substrat\*,
- 7) Substratpuffer\*,
- 8) Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten (sMTP).

\* Fertiglösungen (die Zusammensetzung ist nicht beschrieben)

#### **Das Testprinzip:**

Der Test arbeitet mit zwei Antikörpern gegen DNA und Histon nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonucleosomen in Zellkulturüberständen und Zell-Lysaten. Dabei bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histonkomponenten der Nucleosomen und gleichzeitig durch Biotinylierung an die mit Streptavidin beschichtete MTP. Der zweite Anti-DNA Antikörper bindet an den DNA Bestandteilen des Nucleosoms. Da dieser mit POD konjugiert ist, läßt sich die Menge des

gebundenen Antikörpers, und damit der Nucleosomen, über den Umsatz von ABTS (2,2'-Azino-di [3]-ethyl-benzthiazolin-sulfonat) photometrisch bei 405 nm bestimmen.

### **Durchführung des Versuchs:**

Humane U-937 Lymphomazellen wurden bis zu einer durchschnittlichen Zelldichte von  $10^6$  Zellen /ml angezogen.  $10^4$  Zellen in 200 µl wurden dann in Mikrotiterplatten mit runden Böden mit verschiedenen Konzentrationen von Tubulysin ( $0$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $1,0$  und  $4 \mu\text{M}$ ) inkubiert. Ein Parallelansatz mit Camptothecin diente als positive Kontrolle. Für Camptothecin ist bekannt, daß es durch Hemmung der Topoisomerase-1 eine Apoptose induziert. Die Inkubationszeit mit Tubulysin bzw. Camptothecin bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  betrug 6 Stunden.

Die Zellen wurden danach bei  $200 \times g$  für 10 min in den Mikrotiterplatten abzentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Zellen wurden in 200 µl Lysepuffer lysiert (Fertiglösung) und die unlöslichen Zellreste nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur bei  $200 \times g$  für 10 min abzentrifugiert.

Die weiteren Schritte des Versuchs wurden genau nach Vorschrift der Firma Boehringer-Mannheim durchgeführt.

### **2.8.9.2 Bestimmung von DNA-Fragmenten**

Zum Nachweis und zur Quantifizierung einer Apoptose wurde noch ein weiterer ELISA (Kat.-Nr. 1 585 045) der Firma Boehringer-Mannheim eingesetzt. Dieser Test mißt die Freisetzung von Fragmenten der DNA, in die vor der Apoptose 5'-Bromo-2'-desoxy-uridin (BrdU) eingebaut worden war.

Die Freisetzung der BrdU-markierten DNA-Fragmente in das Cytoplasma während der Apoptose kann in einem Sandwich-ELISA über die gleichzeitige Bindung eines Anti-DNA und eines Anti-BrdU Antikörpers bestimmt werden.

**Inhalt des Bestimmungskits:**

- 1) monoklonaler Anti-DNA-Antikörper,
- 2) monoklonaler Anti-DNA-Antikörper der Maus mit Peroxidase (POD) konjugiert,
- 3) Beschichtungspuffer, 10fach\*
- 4) Waschpuffer, 10fach\*
- 5) Inkubationspuffer, 2fach\*
- 6) Peroxidase-Substrat Lösung\*
- 7) 10 mM steriles BrdU (5'-Bromo-2'-desoxy-uridin) in PBS, pH 7

\* Fertiglösungen (die Zusammensetzung ist nicht beschrieben)

**Weitere benötigte Lösungen und Geräte:**

- 1) Stopp-Lösung: 560 µl konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 8 ml Aqua dest.,
- 2) Exonuclease III, Boehringer-Mannheim: Eine Lösung von 10 U/ml wurde am Tag des Versuchs in Exonuclease-Puffer (66 mM Tris, 0,66 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0) angesetzt. Die Exonuclease dient zur Denaturierung der DNA.
- 3) 0,25 M NaOH,
- 4) 0,25 M HCl,
- 5) 0,2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,
- 6) 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 7) Mikrotiterplatten (MTP) mit runden Böden,
- 8) MTP mit flachen Böden,
- 9) MTP-Schüttler,
- 10) MTP-Reader.

**Durchführung des Versuchs:**

Der Versuch wurde unter leichter Modifikation der Vorschrift der Firma Boehringer-Mannheim, durchgeführt.



**a) Markierung und Vorbereitung der Zellen**

U-937 Lymphomazellen wurden in 10 ml-Kulturflaschen in RPMI-Medium über 48 Stunden bis zu einer durchschnittlichen Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen /ml angezogen. Die Zellen wurden in der Regel für 18 Stunden mit  $10 \mu\text{M}$  BrdU inkubiert.

Am nächsten Tage wurden die Zellen nach Zentrifugation (5 min bei  $250 \times g$ ) gewaschen und in warmem RPMI-Medium ohne BrdU resuspendiert (Zellzahl ca.  $10^5$  Zellen /ml).

$10^4$  Zellen wurden in Titerplatten mit runden Böden mit verschiedenen Tubulysin-konzentrationen (0, 0,1, 0,5, 1, 5 und  $10 \mu\text{M}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  für 6 Stunden inkubiert.

**b) Herstellung der Cytoplasmafraktionen**

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Mikrotiterplatten (MTP) bei  $250 \times g$  zentrifugiert, der Überstand wurde entnommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Analyse mit dem ELISA gelagert.

Die Zellen wurden mit dem Inkubationspuffer (pro Well 200  $\mu\text{l}$ ) lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die MTP noch einmal bei  $250 \times g$  für 10 min zentrifugiert und die Cytoplasmafraktionen entnommen. Die Proben konnten bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zu 3 Tage gelagert werden.

**c) Herstellung einer Positivkontrolle durch zelleigene Endonucleasen**

Um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurden die Endonucleasen im Zell-Lysat durch  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen aktiviert, die als Bestandteile im Kulturmedium vorhanden sind. Dabei wurde zu 200  $\mu\text{l}$  mit BrdU markierten Zellen 100  $\mu\text{l}$  von 1 % (v/v) Triton X-100 gegeben und für 6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min bei  $250 \times g$ ) wurde der Überstand für den ELISA-Test entnommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

**d) Herstellung eine Positivkontrolle durch Spaltung der DNA mit NaOH**

500  $\mu\text{l}$  einer Suspension von Zellen, die mit BrdU-markiert waren, wurden abzentrifugiert und 30

min lang bei Raumtemperatur in 125 µl 0,25 M NaOH inkubiert. Danach wurde die Suspension mit 125 µl 0,25 M HCl neutralisiert und mit 250 µl 0,2 M  $K_2HPO_4$ /  $KH_2PO_4$ , pH 7,0 gepuffert. Die Lösung wurde 5 min lang bei 1100 x g zentrifugiert und der Überstand für den ELISA-Test bei -20 °C gelagert.

#### **e) Beschichtung der Mikrotiterplatten**

Kurz vor Gebrauch wurde 0,2 ml Anti-DNA-Antikörper Lösung mit 9,8 ml Beschichtungspuffer (1 x) verdünnt. Je 100 µl dieser Beschichtungslösung wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Diese wurden mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und bei 37 °C für mindestens eine Stunde inkubiert.

Nach Entfernung der Beschichtungslösung wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Zugabe von 200 µl Inkubationspuffer blockiert (30 min bei Raumtemperatur). Die Titerplatte wurde dreimal (für 2-3 min) mit 250-300 ml Waschpuffer gewaschen.

#### **f) DNA Denaturierung und Immunreaktion**

In die beschichtete MTP wurden die Zellüberstände oder Zell-Lysate pipettiert, mit selbstklebender Folie bedeckt und bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert. Dabei bindet die DNA an den Anti-DNA-Antikörper. Nach dem Waschen kann die gebundene DNA entweder durch 5 minütige Behandlung in einem Mikrowellenherd (650 W) oder enzymatisch durch Inkubation mit Exonuclease III (10 U/ml) bei 37 °C für 30 min denaturiert werden. Nach dem Abkühlen bzw. Waschen wurden je 100 µl Anti-BrdU-POD Konjugat zugegeben, die Platten mit Folie verschlossen und bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert.

#### **g) Photometrische Messung**

Nach dem Waschen (3 x 250 µl Waschlösung je Well) wurde die Substratlösung zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 10-30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 25 µl Stopp-Lösung beendet und die Absorption bei 450 nm gemessen.

### **2.8.9.3 Nachweis der Apoptoseleiter**

Bei der Apoptose werden endonucleolytische Reaktionen aktiviert. Sie führen zur Spaltung des Zellgenoms, zuerst in große DNA Bruchstücke zwischen 300 und 50 kb und später zu Mono- und Oligonucleosomen mit definierter Länge (Oberhammer et al., 1993; Walker et al., 1994). Die DNA-Fragmente können durch Agarosegelelektrophorese getrennt und als Apoptoseleiter nachgewiesen werden.

#### **Lösungen und Puffer**

##### **a) Fertige Lösungen und Puffer (Takara Biomedical)\***

- Lyse-Puffer,
- 10 % ige SDS Lösung,
- Enzym A und B,
- Fällungsmittel,
- Lade-Puffer.

\* Die Zusammensetzung der Lösungen ist nicht beschrieben.

##### **b) Vorbereitung der Zellen und Isolierung der DNA**

48 Stunden alte U937 Zellen (ca.  $10^6/\text{ml}$ ) wurden in Zellkulturflaschen ein bzw. zwei Tage mit 50 nM Tubulysin inkubiert und danach mit PBS gewaschen.

Aus diesen Zellen wurde die DNA nach der Vorschrift von Takara Shuzi Co. (Ltd) isoliert.

Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml-Gefäß überführt und bei 2000 x g bei Raumtemperatur für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 100 µl Lyse-Puffer suspendiert und für 5 min bei 1100 x g zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß wurde das Pellet mit weiteren 100 µl Lyse-Puffer vermischt und erneut zentrifugiert. Die vereinigten Überstände (200 µl) wurden nach Zugabe von 20 µl 10%iger SDS-Lösung und 20 µl Enzym A (Protease) bei 56 °C eine Stunde lang inkubiert. Die Mischung wurde nach Zugabe von 20 µl Enzym B bei 37 °C für eine weitere Stunde inkubiert.

Dann wurden 130 µl Fällungsmittel und 950 µl Ethanol pro Ansatz zugegeben. Bei -20 °C wurden die DNA-Fragmente während einer Inkubationszeit von 60 bis 90 min ausgefällt. Die Ansätze wurden bei 12000 x g für 15 min zentrifugiert und die DNA-Pellets mit 1 ml Ethanol (80 %ig) gewaschen. Nach erneuter 15-minütiger Zentrifugation wurden die Pellets im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer suspendiert.

### **c) Elektrophorese**

#### **Lösungen und Geräte:**

- A)** Elektrophorese-Puffer (TBE 5x): In einem Liter Wasser wurden 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure und 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) gelöst. Der TBE-5x-Puffer wurde vor Gebrauch 10-fach verdünnt um TBE 0,5x herzustellen.
- B)** DNA-Färbe-Puffer (Ethidiumbromid-Puffer): Ethidiumbromid 0,5 µg/ ml TBE 0,5x.
- C)** Lade Puffer: Fertig-Lösung (Takara Schuzi)
- D)** Elektrophorese-Gerät und Stromversorgung ST504 (Gibco BRL). Ein Lauf dauerte unter diesen Bedingungen 16 Stunden bei einer Stromstärke von 8 bis 10 mA.

## 2.9 *In vitro*-Untersuchungen

### 2.9.1 Isolierung von Mikrotubuliprotein aus Schweinehirn

Tubulin wird in der Regel aus Hirngewebe gewonnen. Prinzipiell sind Hirne aller Säugetiere dafür geeignet, doch verwendet die Mehrzahl der Forscher, die sich mit Antitubulin-Wirkstoffen beschäftigen, Rinder- oder Schweinehirn. In dieser Arbeit wurde nur Schweinehirn als Quelle für das benötigte Tubulin verwendet. Tubulin hat die Eigenschaft, sich in der Wärme reversibel zu Mikrotubuli zusammenzulagern, in der Kälte werden die Mikrotubuli depolymerisiert. Diese Eigenschaft bietet die Möglichkeit, durch abwechselndes Erwärmen und Abkühlen und dazwischengeschaltete Zentrifugationsschritte Mikrotubuliprotein aus cytosolischen Extrakten aufzureinigen. Man benötigt neben einem geeigneten Puffer (pH 6,4-6,9) meist noch GTP,  $Mg^{2+}$  und EGTA (zur Komplexierung störender  $Ca^{2+}$ -Ionen).

Etwa 600 g frisches Schweinehirn wurde von Hirnhäuten und Blutgefäßen befreit und mehrfach mit eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung blutfrei gewaschen. Das Hirn wurde dann in 900 ml eiskaltem PEM-Assembly-Puffer (2.1.1) plus 63  $\mu$ l 2-Mercaptoethanol in einem Mixer (Rotor-Blender GT 800) homogenisiert. Das Homogenat wurde zu 60 ml aliquotiert und jeweils mit einem Teflon-Glas-Homogenisator erneut homogenisiert. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (GSA-Rotor, 12000 UpM, 2 °C, 90 min). Der gesamte Überstand (ca. 800 ml) wurde 30 min lang bei 37 °C mit 0,1 mM GTP und 2,5 mM ATP inkubiert, in 200 ml-Aliquots aufgeteilt und anschließend in Zentrifugenbechern mit 10%iger Saccharoselösung in PEM-Puffer unterschichtet und zentrifugiert (GSA-Rotor, 12000 UpM, 37 °C, 45 min). Die gesamten Pellets wurden in insgesamt 75 ml eiskaltem PEM-Puffer + 1 mM GTP resuspendiert und im Teflon-Glas-Homogenisator bei 2000 UpM homogenisiert. Um die Mikrotubuli zu depolymerisieren, wurde die Suspension 30 min lang auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (SS-34-Rotor, 18000 UpM, 2 °C, 30 min). Der Überstand, der das depolymerisierte Tubulin enthält, wurde dann in 8 x 12 ml-Ultrazentrifugationsgefäße aufgeteilt, zur Polymerisation 15 min bei 37 °C inkubiert und bei 37 °C für 30 min (18000 UpM) zentrifugiert. Die letzten Pellets wurden entweder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert oder wiederholt in eiskaltem Puffer mit 1 mM GTP resuspendiert. Nach Entfernen von Aggregaten durch Zentrifugation wurde das gewonnene Mikrotubuliprotein zu einer Endkonzentration von etwa 2 mg/ml verdünnt. Auch

diese Präparationen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C bis zum Gebrauch gelagert (Vallee, 1986; Shelanski et al., 1973). Das isolierte Mikrotubuliprotein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, im Polymerisationstest oder durch Negativkontrast-Elektronenmikroskopie überprüft.

### **2.9.2 Herstellung von MAP-freiem Hirntubulin (PC-Tubulin)**

Mikrotubuliprotein, das über Polymerisations- und Depolymerisationsschritte gereinigt wurde (2.4.1), enthielt noch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs). Da Tubulin ein ziemlich saures Protein ist, der isoelektrische Punkt der MAPs aber im Neutralbereich liegt, können die MAPs durch Kationenaustausch-Chromatographie entfernt werden (Weingarten et al., 1975; Berkowitz et al., 1977; Fellous et al., 1975). Für die hier beschriebenen Versuche wurde das Mikrotubuliprotein über eine Phosphocellulose-Säule (12 x 1,5 cm, Whatmann P11) gereinigt (1 ml gequollene Phosphocellulose für 2 bis 3 mg Mikrotubuliprotein). Die Phosphocellulose wurde mit Natronlauge aktiviert (40 g Phosphocellulose pro Liter 0,5 M NaOH, 5 min), das entstandene Gel bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 9 mit Wasser gewaschen, danach in einem Liter 0,5 M HCl suspendiert und erneut mit Wasser bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4 gewaschen. Schließlich wurde das Gel in MES-A-Puffer (25 mM MES; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM DTT [D, L-Dithiothreitol]; 0,1 mM EDTA und 0,1 mM GTP; pH 6,4) suspendiert und auf pH 6,4 eingestellt. Die Säule wurde gefüllt und mit MES-Puffer (1 mM MES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 1 mM GTP, pH 6,4) äquilibriert. Die Mikrotubuliprotein-Pellets (aus 2.4.1) wurden einem dritten Polymerisation-Depolymerisations-Zyklus unterworfen, in MES-Puffer aufgenommen, filtriert (Membrex-Filter 0,2 µM) und mit einer Flußrat von 0,1 bis 0,3 ml/min über die Phosphocellulosesäule gepumpt. Für die Chromatographie wurde ein FLPC-System (Pharmacia) mit Fraktionsammler benutzt. Reines Tubulin eluierte im Durchbruch, da es auf Grund seines sauren Charakters nicht an die Phosphocellulose bindet. Die MAPs wurden mit 0,8 M NaCl in MES-A Puffer eluiert. Die Protein-Fractionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft. Das Tubulineluat wurde durch Ultrafiltration (Centriplus Microconcentrator, Amicon) konzentriert. Eluate mit MAPs wurden gegen MES-A Puffer dialysiert und konzentriert. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

### **2.9.3 Herstellung von GTP- und $Mg^{2+}$ -freiem Tubulin**

GTP- und  $Mg^{2+}$ -freies Tubulin wurde durch Gelfiltration gewonnen. Eine Sephadex-10 Säule (PD-10, Pharmacia) wurde zuerst mit 15 ml PEM-Puffer (2.1.1) äquilibriert. Danach wurden 2,5 ml Tubulinlösung mit 2 bis 5 mg/ml aufgetragen und mit weiteren 5 ml PEM-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und die Proteinkonzentration bestimmt.

### **2.9.4 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen wurden nach folgenden Methoden bestimmt:

#### **1) Bradford**

Protein wurde nach Bradford (1976) bestimmt, wobei BSA (Rinderserumalbumin) als Standardprotein benutzt wurde. Als Reagenz wurde eine Fertiglösung der Firma Bio-Rad verwendet. Die Methode mißt nicht nur Tubulin und MAPs, sondern sämtliche Proteine. Nur bei hoher Reinheit der Tubulinpräparationen kann der gemessene Proteingehalt mit dem Gehalt an Mikrotubulinprotein gleichgesetzt werden. Der Testansatz enthielt 10  $\mu$ l Proteinlösung, 20  $\mu$ l 1 % (w/v) NaOH, 70  $\mu$ l Wasser und 2 ml verdünnte Bradfordlösung (vor dem Test 1 : 5 verdünnt). Gemessen wurde die Absorption bei 595 nm.

#### **2) Guanidin-Hydrochlorid**

Diese Methode hat den Vorteil gegenüber der Bradford-Methode, daß man die Konzentration der Mikrotubuli-Proteine in Gegenwart anderer Proteine bestimmen kann, die als Verunreinigungen vorhanden sind. 25  $\mu$ l Tubulinlösung wurden mit 1 ml einer 6 M Guanidin-Hydrochlorid Lösung versetzt und photometrisch gegen den Blindwert von Guanidin-HCl bei 275 nm gemessen. Der Konzentrationsberechnung von Tubulin wurde ein Absorptionskoeffizient von  $1,03 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  zugrunde gelegt (George, 1981).

### 3) SDS-Phosphatpuffer

Die Tubulin-Konzentration kann auch direkt photometrisch bei 275 nm in Phosphatpuffer (10 mM Phosphatpuffer, 1% SDS, pH 7,0 ) bestimmt werden. Man berechnet die Konzentration mit Hilfe eines Absorptionskoeffizienten von  $107.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Andreu et al., 1984).

## 2.9.5 Elektrophoretische Methoden

### 2.9.5.1 Vorbereitung von Proben für die Gelelektrophorese

Die Proben wurden im Verhältnis 1: 1 mit SDS-Puffer vermischt und gegebenenfalls vor dem Auftragen 3 Minuten lang in kochendem Wasser erhitzt.

**Tab. 2.5 Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers (zweifach konzentriert)**

Komponente	Volumen [ml]
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	2,0
H <sub>2</sub> O	2,4
SDS, 20 %	1,0
Mercaptoethanol	0,5
Bromophenolblau (1,0 %)	0,1
Glycerin	5,0

### 2.9.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde in einem modifizierten vertikalen Gelelektrophorese-System nach Laemmli (1970) durchgeführt (Geldicke 1 mm).



**Lösungen und Puffer:**

- A) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: Fertiglösung der Fa. Biometra (30 % Acrylamid + 0,8 % Bis (=N,N'-Methylen-diacrylamid))
- B) Trenngelpuffer: 0,5% SDS in 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- C) Sammelgelpuffer: 0,5 % SDS in 0,5 M Tris/HCl, pH 6,6
- D) 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)
- E) TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin)
- F) SDS-Elektrophoresepuffer (10fach): 20 mM Tris, 50 mM Glycin, 1 % SDS, pH 8,8
- G) SDS-Fixierlösung: 400 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, 500 ml dest. Wasser
- H) SDS-Entfärbelösung: 250 ml Ethanol, 80 ml Essigsäure, 670 ml dest. Wasser
- I) Färbelösung: 0,29 g Coomassie-Blau (Sigma R 250) in 250 ml Entfärbelösung wurde auf 60 °C erhitzt und filtriert.

**Tab. 2.6      Zusammensetzung der Polyacrylamidgele**

Komponenten	Trenngel 5 %	Trenngel 7 %	Sammelgel
A	5,0 ml	7,0 ml	1,3 ml
B	7,5 ml	7,5 ml	-
C	-	-	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	17,9 ml	15,2 ml	6,2 ml
D	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
E	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

**Die Durchführung:**

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zur vollständigen Auspolymerisation benötigten die Trenngele ca. 20 min und die Sammelgele ca. 30 min. In letztere wurden mit Teflonkämmen pro Gel 10 Taschen mit einem Volumen von etwa 30 µl einpolymerisiert. Pro Tasche wurde bis 15 µl der Probe aufgetragen. Als Standard wurde ein Proteinmarker mit einem

Molekulargewicht von 10 kDa (Gibco, BRL) benutzt. Es wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Lauf dauerte unter diesen Bedingungen 80 bis 100 min.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zugeschnitten und ca. 40 min mit Lösung G fixiert. Die anschließende Färbung mit Coomassie-Blau Lösung I dauerte 60 bis 90 min. Danach wurde das Gel in Lösung H unter ständigem Schütteln entfärbt, für ca. 15 min in 87 %iger Glycerin-Lösung gehalten und schließlich in Mashfolie eingeschweißt.

### **2.9.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Trennung von $\alpha$ -und $\beta$ -Tubulin**

Zur besseren Auftrennung von  $\alpha$ -und  $\beta$ -Tubulin wurde die oben beschriebenen Methode (2.9.6.2) folgendermaßen modifiziert:

- 1) Die pH Werte von Trenngel und Elektrophoresepuffer wurden auf 9,3 statt 8,8 eingestellt.
- 2) Das normale SDS wurde in allen Lösungen durch ein spezielles SDS (Sigma, L-5750), das Cetyl- und Myristylsulfat enthält, ersetzt.

## **2.9.6 Tubulin-Polymerisation**

### **2.9.6.1 Polymerisations-Tests zur Messung der Mikrotubuli-Bildung**

Die Bildung von Mikrotubuli *in vitro* ist temperaturabhängig (Weisenberg, 1972; Borisy und Olmsted, 1972). Es gibt eine Reihe von Verfahren, um die Mikrotubulibildung *in vitro* quantitativ zu erfassen. Am häufigsten werden Turbidimetrie (Trübungsmessung) und Elektronenmikroskopie angewendet, aber auch Viskositätsmessung, Sedimentationsbestimmung, immunchemische Methoden und andere wurden angewendet.

#### **A) Photometrische Messung (Turbidimetrie)**

Der Polymerisationsverlauf wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer

Wellenlänge von 350 nm verfolgt. Das verwendete Beckmann-Photometer (Dioden-Array Spektrophotometer DU 7500) war mit einem Küvettenwechsler ausgestattet. Die Daten wurden über das eingebaute Kinetikprogramm erfaßt und konnten während der Messung graphisch oder tabellarisch auf dem Monitor dargestellt werden. Zur Hintergrundkorrektur wurde eine zweite Wellenlänge von 250 nm gewählt. Da die auf Eis vorbereiteten kalten Küvetten beim Erwärmen beschlugen, war es nötig, nach dem Temperaturwechsel bis zum Beginn der Messung ca. 30 Sekunden zu warten. In dieser Zeit hatte sich die Küvetten bereits genügend erwärmt, um nach dem Abwischen nicht mehr neu zu beschlagen. Die Messung sollte dann innerhalb der nächsten 30 Sekunden gestartet werden.

## **B) Viskosimetrie**

Der Ablauf der Polymerisation von Tubulin wurde auch über Viskositätsmessungen verfolgt (Olmsted und Borisy, 1973). Das Tubulin wurde in PEM-Puffer mit 1 mM GTP auf 1,6 mg/ml verdünnt und die Zunahme der Viskosität der Lösung mit einem Mikro-Viskosimeter nach Ostwald (Schott Geräte Typ 51610 / I; Kapillardurchmesser 0,43 mm; Meßbereich 0,4-6 mm/s) bei 30 °C gemessen. Das Volumen der vermessenen Lösung betrug 1 ml.

## **C) Sedimentationsmethode**

Abzentrifugieren der entstandenen Mikrotubuli ist eine dritte Möglichkeit, um den Verlauf der Polymerisation zu verfolgen. Mikrotubuliprotein wurde bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die gebildeten Mikrotubuli wurden bei 39.000 x g für 40 min abzentrifugiert. Das glasklare Pellet wurde in 100 µl dest. Wasser suspendiert und die Menge der polymerisierten Mikrotubuli über eine Proteinbestimmung gemessen.

### **2.9.6.2 Der Einfluß von Wirkstoffen auf die Tubulinpolymerisation**

Das Mikrotubuliprotein wurde aufgetaut, das Pellet 1: 15 in PEM-Puffer (pH 6,6) + 1 mM GTP (2.1.1) resuspendiert, 40 min auf Eis depolymerisiert und die Suspension bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Tubulin des Überstandes wurde mit eiskaltem PEM-Puffer bis zu einer

Konzentration von 1,2 bis 2 mg/ml (10-16  $\mu$ M) verdünnt. Von den zu testenden Wirkstoffen wurden Lösungen in den entsprechenden Konzentrationen in DMSO hergestellt. Je 195  $\mu$ l Tubulinlösung wurden in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) mit 5  $\mu$ l der jeweiligen Wirkstofflösung oder reinem DMSO für 5 min auf Eis inkubiert.

Die zu vermessenden Reaktionsmischungen wurden mit einer Mehrkanalpipette gleichzeitig in die vorgewärmten Mikroküvetten (Schichtdicke: 1 cm; Volumen: 0,2 ml) überführt. Der Polymerisationsverlauf wurde bei 37 °C 10 bis 20 Minuten lang bei 350 nm verfolgt und graphisch dargestellt.

### **2.9.6.3 Wirkung von Tubulysin auf polymerisiertes Tubulin (Mikrotubuli)**

200  $\mu$ l Tubulin-Lösung (10 bis 12  $\mu$ M) wurde in Mikroküvetten bei 37 °C inkubiert und die Polymerisation durch Messung bei 350 nm verfolgt. Nach ca. 10 min, nachdem eine maximale Polymerisation erreicht war, wurde Tubulysin in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 5  $\mu$ M) zugegeben und die Reaktion für weitere 10 min verfolgt. Nach ca. 20 min wurden die Küvetten für ca. 5 min auf Eis inkubiert. Der Polymerisationsverlauf wurde darauf erneut für 10 min bei 37 °C verfolgt.

### **2.9.6.4 Der Einfluß von Tubulysin auf eine durch Taxol induzierte Tubulin-Polymerisation**

Einige antimitotische Substanzen wie Taxol, Taxotere und Epothilon fördern die Tubulinpolymerisation in den Zellen und stabilisieren die Mikrotubuli (Rowinsky et al., 1992). In Gegenwart dieser Verbindungen polymerisiert das Tubulin bei niedriger Temperatur, geringerer Proteinkonzentration und in Abwesenheit von GTP und MAPs (Kumar, 1981, Hamel et al., 1981). In der vorliegenden Arbeit wurde die Einwirkung von Tubulysin A auf die Taxol-induzierte Polymerisation untersucht.

Je 200  $\mu$ l Tubulin-Lösung (6  $\mu$ M) wurde mit Tubulysin (0 bis 5  $\mu$ M) vermischt und 5 min lang auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung in die bei 37 °C vorgewärmten Küvette gegeben.

Nach 7 Minuten wurde Taxol zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde bei 350 nm für weitere 10 bis 20 min photometrisch verfolgt und graphisch dargestellt.

In einem zweiten Versuch wurden Tubulysin und Taxol vor der Messung bei 4 °C mit Tubulin vermischt.

## **2.9.7 Elektronenmikroskopie: Negativkontrastierung**

Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) entsteht das Bild eines Objekts in Form von Helligkeitsunterschieden zwischen Objekteinheiten bzw. Untergrund. Dieser Schwärzungsunterschied spiegelt eine bestimmte 'Elektronen-Dichte'-Verteilung im Präparat wider. Durch Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und der Materie des Objekts entsteht das Bild des Objekts. Nach Einbetten in Schwermetallsalz erscheint das Objekt hell vor dunklem Hintergrund. Durch Negativkontrastierung können Makromoleküle und Zellkomponenten von Eukaryonten und Bakterien mit feineren Details beobachtet werden.

### **Negativkontrastierungsmittel:**

Als Negativkontrastierungsmittel wurde eine wässrige Lösung von 4 % Uranylacetat verwendet.

### **Herstellung der Trägerfilme:**

Ultradünnschnitte sind nicht ausreichend stabil, um die Öffnungen von Objektträgernetzen, auf die sie aufgebracht werden müssen, dauerhaft zu überspannen. Andere Objekte sind sogar kleiner als die Öffnungen des Trägernetzes. Deshalb ist die Herstellung eines stützenden Trägerfilms zwischen Objekt und Trägernetz notwendig. Die Trägerfilme werden aus Kunststoffen wie Kollodium (auch Parlodium genannt), Nitrocellulose, Kohle, Siliciumoxid oder Formvar (ein Polyvinylformaldehyd) hergestellt. Sie werden zur Stabilisierung mit einer dünnen Kohleschicht bedampft. Im allgemeinen werden diese Trägerfilme auf Kupfer-Trägernetzen (Grid) aufgebracht.

Die Herstellung der Trägerfilme wurde unter Anweisung von Dr. Heinrich Lünsdorf (Abteilung Mikrobiologie, GBF Braunschweig) durchgeführt.

## Vorbereitung der Präparate

Mikrotubuliprotein in einer Konzentration von 12  $\mu\text{M}$  und PC-Tubulin (MAP-freies Tubulin) in einer Konzentration von 16  $\mu\text{M}$  wurden mit oder ohne Tubulysin 20 min bei 37 °C inkubiert. Die nächsten Schritte wurden alle bei 30 °C durchgeführt. Die Proben wurden 1:1 mit warmem PEM-Puffer + 1 mM GTP verdünnt und 5 bis 10  $\mu\text{l}$  davon wurden an Kohlefilme adsorbiert. Der Kohlefilm mit den daran haftenden Proteinen wurde mit warmem PEM-Puffer gewaschen und dann sofort auf Uranylacetat übertragen. Der schwimmende Kohlefilm wurde mit einem Kupfer-Grid aufgefangen und mit einem Filterpapier das überschüssige Uranylacetat abgesaugt. Die getrockneten Präparate konnten dann mit einem CEM 902 Elektronmikroskop der Fa. Zeiss untersucht werden. Die auf die Vorbereitung der Präparate folgenden Schritte wurden gemeinsam mit Dr. Lünsdorf, GBF, durchgeführt.

## 2.9.8 Untersuchungen zur Bindungsstelle des Tubulysins am Tubulin

Antimitotische Substanzen haben teilweise unterschiedliche Bindungsstellen an den Tubulindimeren. Man unterscheidet hier vor allem zwei Bindungsstellen, die Colchicin- und die Vinca-Domäne. Verschiedene Hemmstoffe können sich kompetitiv oder nicht-kompetitiv zueinander verhalten. Konkurrenzversuche wurden mit radioaktiv markiertem Colchicin und Vinblastin durchgeführt.

### 1) Bindungsreaktion

In 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden 0,5 ml Mikrotubuliprotein (0,6-0,7 mg/ml) in PEM-Puffer (pH 6,6) pipettiert. Die Endkonzentration des Colchicins war 5 bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$  und die spezifische Aktivität war 0,8  $\mu\text{Ci/ mmol}$  (von einer 200  $\mu\text{Ci/ml}$  Stammlösung benötigt man 5 bzw. 10  $\mu\text{l}$  [Ring-C-Methoxy- $^3\text{H}$ ]-Colchicin (DuPont NEN). Schließlich wurden verschiedene Konzentrationen (bis 12  $\mu\text{M}$ ) von Tubulysin A dazu pipettiert. Die Ansätze wurden auf einem Thermomixer (Eppendorf) für 60 min bei 35 °C inkubiert, danach für 10 min auf Eis gehalten. In Konkurrenzversuchen zu Vinblastin wurde  $^3\text{H}$ -Vinblastinsulfat, spezifische Aktivität 0,5  $\mu\text{Ci/ mmol}$  (Amersham International) eingesetzt.

## 2) Abtrennung der gebundenen Radioaktivität

Um das gebundene Colchicin bzw. Vinblastin abzutrennen, wurden zwei Methoden angewendet, Filtration über Filterpapier und Gelfiltration.

### Filterpapier-Trennung

Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis gelegt. Pro Ansatz wurden 4 Rundfilter (DE81-Whatmann) in PEM-Puffer getaucht und auf einem Filterhalter plaziert. Von der Reaktionsmischung wurden 450 µl auf das Filterpapier pipettiert und mit 1 ml 6 % Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt. Nun wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und schließlich 5 mal mit 2-3 ml TCA und 1 mal mit Wasser nachgewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Filterpapiere 10 Sekunden lang trocken gesaugt und in Scintillationsgefäße mit 3 ml Szintillationscocktail (Beckman) überführt. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

### Trennung durch Gelfiltration

Die nicht gebundene Radioaktivität konnte auch durch Gelfiltration über PD-10-Säulen (Sephadex-25, Pharmacia) abgetrennt werden. Die Säulen wurden mit 15 ml PEM-Puffer äquilibriert, die Ansätze mit 2 ml PEM Puffer vermischt und auf die Säulen gegeben. Diese wurden dann mit weiteren 5 ml PEM-Puffer eluiert und Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde 350 µl zu 3 ml Flüssigszintillationscocktail gegeben und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

## 2.9.9 Interaktion zwischen Tubulin und Tubulysin

Colchicin, Vinblastin und Podophyllotoxin blockieren *in vitro* in niedrigen Konzentrationen die Polymerisation von Tubulin (Wilson et al., 1976). Es wurde beobachtet, daß die Bindung von Colchicin die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen am Tubulin inhibiert. (Kuriyama und Sakai,

1974; Schmitt und Kram, 1978) Diese Befunde weisen auf eine Beziehung zwischen den Bindungsstellen von Colchicin oder Vinblastin am Tubulin und den Sulfhydryl-Gruppen hin.

### **2.9.9.1 Die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulinalkylierung durch Jod[<sup>14</sup>C]acetamid**

Um einen Einfluß von Tubulysin auf die Sulfhydryl-Gruppen des Tubulins zu untersuchen, wurde Jod[1-<sup>14</sup>C]acetamid als Alkylierungsmittel verwendet.

Mikrotubulinprotein wurde in PEM-Puffer + 0,1 mM Griseofulvin bis zu einer Konzentration von 0,65-0,7 mg / ml verdünnt. Griseofulvin blockiert die Tubulinpolymerisation, die anderenfalls eine Alkylierung inhibieren würde (Ludueno, 1981). In Versuchen mit MAP-freiem Tubulin wurde auf Griseofulvin verzichtet. Die Ansätze wurden mit 10 µM Tubulysin A, Vinblastin oder Phalloidin A bei 37 °C für 60 min inkubiert, danach wurde Jod[<sup>14</sup>C]acetamid zu einer Endkonzentration von 1,25 mM, spezifische Aktivität 1,9 µCi/mmol, zugegeben. Alle 30 min bis 180 min wurde von jedem Ansatz 230 µl auf ein Filter pipettiert und weiter wie unter 2.9.8 behandelt. Schließlich wurde die Radioaktivität des eingebauten Jodacetamids gemessen.

### **2.9.9.2 Die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulin-Alkylierung durch N,N'-Ethylenbis-(jodacetamid) (EBI)**

EBI führt zur Bildung von zwei intramolekularen Quervernetzungen (intra-chain crosslinks) im β-Tubulin und wird ebenfalls für die Untersuchung der Tubulin-Sulfhydrylgruppen angewendet.

#### **Synthese von N,N'-Ethylenbis-(jodacetamid) (EBI)**

Die Synthese von N,N'-Ethylenbis-(jodacetamid) (EBI) erfolgte nach der Methode von Ozawa (1967) aus Ethylendiamin und Jodacetylchlorid. Zuerst wurden das Ethylendiamin (0,05 mol) in 2 Liter NaOH (0,05M) und das Jodacetylchlorid (0,11mol) in 500 ml Ethylenchlorid gelöst. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben und für ca. 10 min kräftig gerührt. Dabei



entstand eine weißes Präzipitat von EBI, das abfiltriert und aus Ethanol kristallisiert werden konnte. Die theoretische EBI-Ausbeute (0,05 mol) wurde schließlich in 20 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Die theoretische Konzentration sollte um 2,5 M liegen.

### **Alkylierungsreaktion**

Tubulin (200  $\mu$ l) wurde in einer Konzentration von 0,8 mg/ml ohne oder mit den Testsubstanzen (20  $\mu$ M Phomopsin A, 20  $\mu$ M Tubulysin oder 40  $\mu$ M Colchicin) für eine Stunde bei 35 °C inkubiert. Danach wurde zu jedem Ansatz 30  $\mu$ l EBI gegeben (theoretische Endkonzentration ca. 0,3 M) und für weitere zwei Stunden bei 35 °C inkubiert. Eine elektrophoretische Trennung erfolgte wie unter 2.9.5.2 bei einer Stromstärke von 20 mA.

### **2.9.10 Der Einfluß von Tubulysin auf den Tubulin-Zerfall (Tubulin decay)**

Anilinnaphthalensulfonat-Verbindungen wie 1,8-Anilinnaphthalensulfonat (1,8-ANS) und Bis-(1,8-Anilinnaphthalensulfonat) (Bis-ANS) sind Marker, die an hydrophobe Bereiche des Proteins binden und dann fluoreszieren (Brand, 1972). Sie binden an die einzelnen Bindungsstellen im Schweinetubulin mit einer Bindungskonstante ( $K_i$ ) von je 2  $\mu$ M (Bis-ANS) bzw. 25  $\mu$ M (1,8-ANS). Die Anzahl nimmt mit zunehmendem Zerfall des Tubulins ab. Eine Fluoreszenzbestimmung des gebundenen Anilinnaphthalensulfonats ergibt daher ein Maß für die Güte des Tubulins. Einige Antimikrotubuli-Stoffe hemmen den Tubulin-Zerfall, z. B. Colchicin, Vinblastin, Podophyllotoxin und Phomopsin A. Einige haben keinen Einfluß, z. B. Maytansin, und andere aktivieren sogar den Prozeß, z.B. IKP104 (2-[4-Fluorphenyl]-1-[2-chlor-3,5-dimethoxyphenyl]-3-methyl-6-phenyl-4[1H]-pyridinon).

### **Einwirkung des Tubulysin auf die Bis-ANS-Tubulin Interaktion**

Das fluoreszierende Bis-ANS kann an mehrere Bindungsstellen des Tubulins binden. Ihre Zahl ist eine Funktion der Zeit und der Temperatur. Die Bis-ANS-Tubulinbindung wird über Messung der

Fluoreszenz bestimmt. Tubulin (0,7 mg/ml) wurde mit den Testsubstanzen (Tubulysin, Vinblastin, Phomopsin A oder Epothilon B) bei 37 °C für 30 min vorinkubiert. Dann wurde Bis-ANS in einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben und für weitere 180 min inkubiert. In 30-minütigem Abstand wurde dabei die Fluorezenszintensität bei 490 nm bei einer Anregungswellenlänge von 385 nm gemessen.

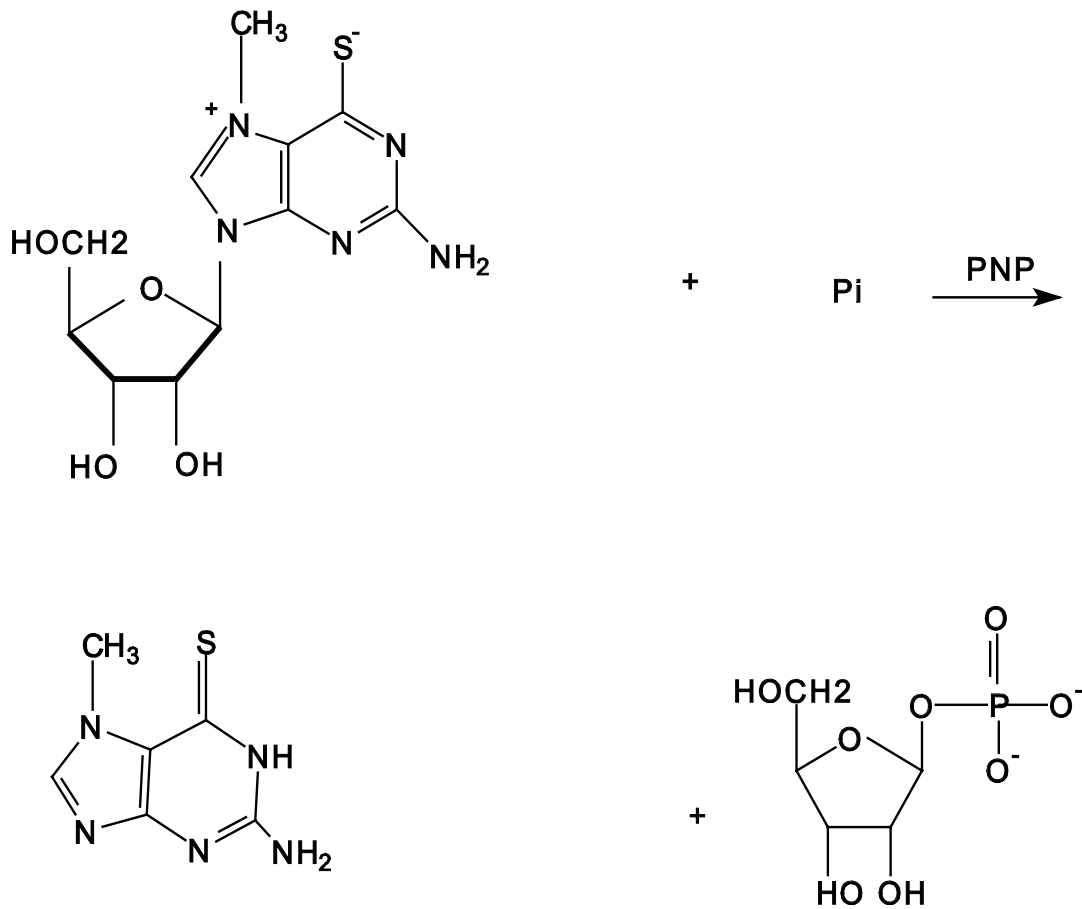
### 2.9.11 Messung der GTPase-Aktivität der Mikrotubuli

Tubulin von Säugetieren enthält zwei GTP-Bindungsstellen, eine nicht austauschbare an der  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit und eine austauschbare an der  $\beta$ -Untereinheit, deren GTP während der Polymerisation hydrolysiert wird (Weisenberg, 1968; MacNeal, 1978; Jacobs, 1984). Der Einfluß von Tubulysin auf die GTPase-Aktivität der Mikrotubuli wurde mit einer veränderten Methode nach Melki et al. (1996) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einer empfindlichen Bestimmung des während der Tubulinpolymerisation freigesetzten anorganischen Phosphats ( $P_i$ ). In dessen Gegenwart katalysiert das Enzym Purinnukleosid-Phosphorylase (PNP) eine Umsetzung von 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin-ribosid (MESG) zu Ribose- 1-phosphat (Abb. 2.1.). Das entstehende 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin wurde bei 360 nm gemessen. Die Zunahme der Absorption durch die Mikrotubulipolymerisation selbst wurde durch Kontrollmessungen korrigiert.

Dazu wurde ein Testansatz der Fa. MoBiTec verwendet (EnzChek™ Phosphate Assay Kit; E-6646).

#### Inhalt des Testkits:

- a) **MESG:** 6,3 mg (20 µmol) wurden in 20 ml Wasser gelöst. Die 1 mM Stamm-Lösung wurde aliquotiert (je 200 µl) und bei -20 °C gelagert. Die Lösungen waren bei Raumtemperatur für ca. 4 Stunden stabil.
- b) **PNP:** Zwei Gefäße mit je 50 U Enzym-Lyophilysat.



### Versuchsprotokoll1

Die MESG-Aliquote wurden vor Gebrauch in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut (nicht länger als 5 min), geschüttelt und auf Eis gelegt. Die Lösung war für ca. 4 Stunden stabil. Die PNP wurde mit 500 µl dest. Wasser zu einer Endkonzentration von 100 U/ml verdünnt.

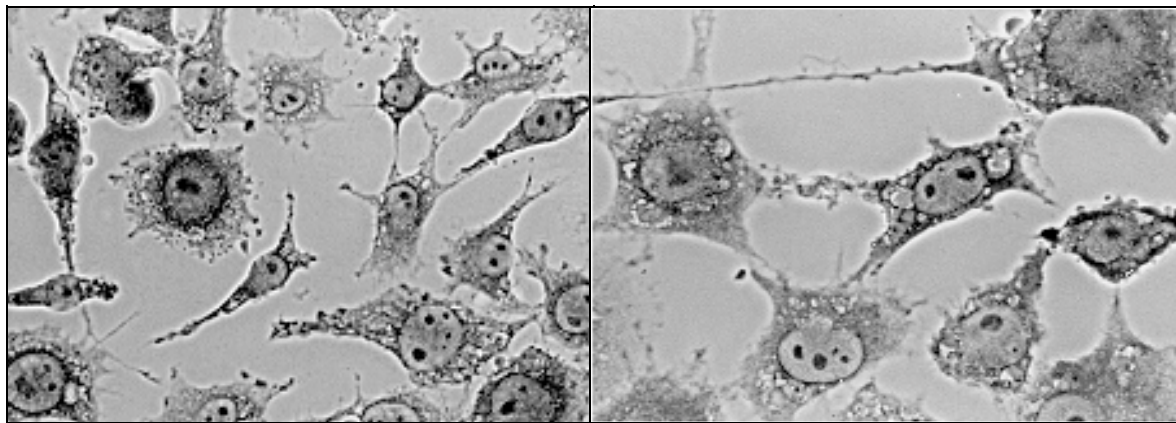
Die Polymerisation von 200 µl Tubulin in PEM-Puffer wurde im Standardverfahren (2.9.6.1 A) verfolgt. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde in jede Reaktionsküvette 23 µl

einer vorgewärmten MESG-Enzym-Mischung (20 µl MESG + 3 µl PNP) gegeben. Die Änderung der optischen Dichte wurde dann für weitere 5 min verfolgt. Der Einfluß von Tubulysin, Vinblastin, Epothilon, Paclitaxel, Colchicin , Phomopsin A auf die GTPase-Aktivität wurde so untersucht.

### **3                    *In vivo*-Ergebnisse**

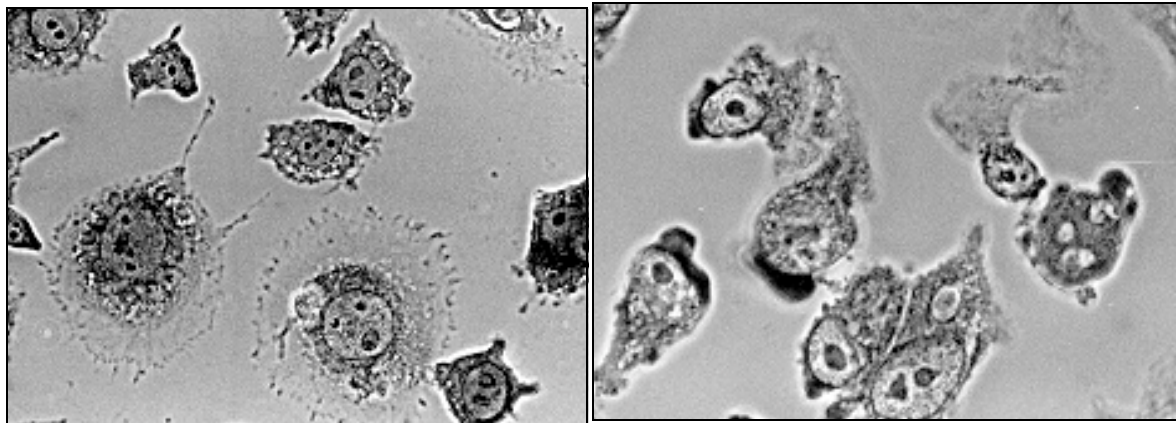
#### **3.1                Einwirkung von Tubulysin auf die Zellmorphologie**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche zur Wirkung von Tubulysin mit kultivierten Zellen (*in vivo*) und auf molekularer und biochemischer Ebene mit gereinigtem Tubulin durchgeführt. Eine Zugabe von Tubulysin führte zu morphologischen Zellveränderungen, die im Lichtmikroskop sichtbar waren. Normal kultivierte L929-Mauszellen wuchsen fibroblastenartig und bildeten einen einschichtigen, geschlossenen Zellrasen. Behandelte Zellen rundeten sich ab, verloren den Kontakt zum Substrat und hafteten weniger gut aneinander. Die Zellen wuchsen nicht mehr in geordneter Weise. Abb. 3.1 zeigt L929-Zellen, die unterschiedlich lang mit Tubulysin inkubiert worden waren. Schon zwei Stunden nach Zugabe von Tubulysin (20 nM) ließen sich die behandelten Zellen von der Kontrolle unterscheiden. Sie waren größer und zeigten weniger Pseudopodien. Nach 4 Stunden hatte sich ein Teil der Zellen radförmig ausgebreitet, andere waren geschrumpft. Nach 8 Stunden hatten sich viele Zellen ausgehend vom Zellrand vom Untergrund abgelöst. Noch anhaftende Zellen waren sternförmig oder länglich. Der Zellkern lag oft am Zellrand. Dieser Effekt war nach 20 Stunden deutlich ausgeprägt.



A) 0 Stunden (Kontrolle)

B) 2 Stunden



C) 4 Stunden

D) 8 Stunden



E) 20 Stunden

**Abb. 3.1** Lichtmikroskopische Aufnahmen von L929-Zellen zeigen die Wirkung von Tubulysin (20 nM) auf die Zellmorphologie.

A) Kontrolle; B) nach 2 Stunden;  
C) nach 4 Stunden; D) nach 8 Stunden;  
E) nach 20 Stunden.

## **3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie**

### **3.2.1 Die Einwirkung von Tubulysin auf die Zellmikrotubuli**

Erste Untersuchung hatten gezeigt, daß die Mikrotubuli der Zellen in Gegenwart von Tubulysin verschwinden (F. Sasse, mündliche Mitteilung). Die Mikrotubuli konnten nach Immunfluoreszenzfärbung im Cytoplasma von PtK2-Beuteltierzellen sichtbar gemacht und mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Zeiss) beobachtet werden. Die markierten Mikrotubuli wurden unter dem Mikroskop mit dem Filtersatz für Rhodamin untersucht. Zellkerne und Chromosomen wurden mit DAPI markiert und waren mit dem entsprechenden Filtersatz sichtbar.

Abbildung 3.3 zeigt Fluoreszenzaufnahmen des Mikrotubulinetzes von PtK2-Zellen. Im Kontrollbild sieht man eine Immunfluoreszenzaufnahme mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Tubulin in PtK2-Zellen. Es zeigt ein Mikrotubuli-Netzwerk, das die Zelle durchzieht. Dieses strahlt von einem stark gefärbten Zentrum (MTOC) in alle Richtungen aus. Klar erkennbar ist eine gleichförmige Stärke der Mikrotubulusfilamente und deren radiale Anordnung. Die Zellkerne erscheinen rundlich bis oval.

Die weiteren Bilder zeigen die Wirkung von 20 ng/ml Tubulysin auf die Mikrotubuli über einen Zeitraum von 10 Stunden. Schon nach zwei Stunden waren die Mikrotubuli kürzer und weniger geordnet. Nach 4 Stunden konnte man eine starke Reduktion der gesamten Mikrotubuli sehen. Sie verloren ihre normale filamentöse Form und ihre strahlenförmige Anordnung. Außerdem waren im Vergleich zu unbehandelten Zellen Tubulinansammlungen oder Aggregate in Form von Flecken besonders im Bereich des Zellkerns zu erkennen. Nach 6 Stunden waren nur desorganisierte Mikrotubulibruchstücke oder diffuse Mikrotubulifilamente um den Zellkern herum zu sehen. Das Mikrotubulinetz hatte sich aufgelöst, und außerdem waren die Zellen abgerundet.

Je länger die Behandlung dauerte, desto schwächer war die Fluoreszenz, d.h. umso weniger Mikrotubulifilamente waren noch vorhanden. Das Mikrotubulinetz war nach 10 Stunden nicht mehr zu sehen. Man erkannte in einigen Zellen noch die stark leuchtenden Centrosomen am Rand des Zellkerns. Nach 18 Stunden Behandlung mit Tubulysin waren keine Mikrotubulireste mehr erkennbar. Ab diesem Zeitpunkt konnten keine Aufnahmen mehr gemacht werden. Nur die

Fluoreszenz der Centrosomen war weiterhin in wenigen Zellen vorhanden. Ab 24 Stunden Behandlung waren auch diese vollständig verschwunden, es konnte keine Fluoreszenz mehr detektiert werden und die Präparate erschienen dunkel. Die gleichen Ergebnisse wurden auch bei L929-Zellen nach Inkubation mit Tubulysin mit gleichem Zeitverlauf gefunden.

Der zeitliche Verlauf war von der Konzentration des Tubulysins abhängig. Eine Behandlung der PtK<sub>2</sub> Zellen mit einer Konzentration von 50 nM Tubulysin führte zu einem schnelleren Abbau der Mikrotubuli. Schon nach 8 Stunden konnten keine Mikrotubuli mehr detektiert werden.

Möglicherweise hat Tubulysin einen direkten Einfluß auf die Centrosomen (MTOC). In manchen Fällen wurde beobachtet, daß die Centrosomen in den ersten Stunden nach Zugabe von Tubulysin zerteilt waren, bevor sie später vollständig verschwanden.

Die DAPI-Färbung zeigte die Wirkung auf den Zellkern. Bei einer Konzentration von 20 bis 30 nM Tubulysin beobachtete man nach ca. 24 Stunden eine Änderung der Zellkernmorphologie. Die Zellkerne wurden etwas größer und verformten sich. Später, 48 Stunden nach Zugabe von Tubulysin, wurde ein Zerfall der Zellkerne in mehrere Teile sichtbar (Abb. 3.2). Genauere Untersuchungen zur Induktion einer Apoptose folgen später.

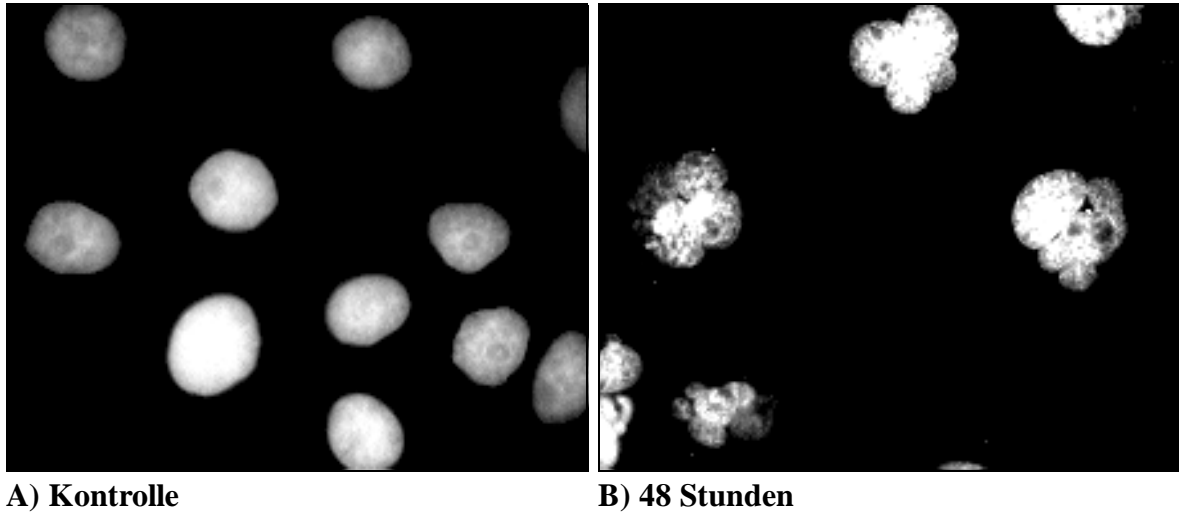
### **3.2.2 Wirkung von Tubulysin auf das Aktin-Cytoskelett der Zelle**

Fluoreszenzaufnahmen des Aktinskeletts nach Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (2.8.4.4) zeigten, daß die PtK<sub>2</sub>-Zellen von regelmäßig angeordneten, geradlinigen Mikrofilamenten, den Streßfasern, durchzogen waren. Nach Behandlung mit Tubulysin (50 nM) wurden auch hier Veränderungen gesehen. Die Form der Streßfasern war durch Behandlung mit Tubulysin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verändert. Sie erschienen zum Zellinneren hin gekrümmt.

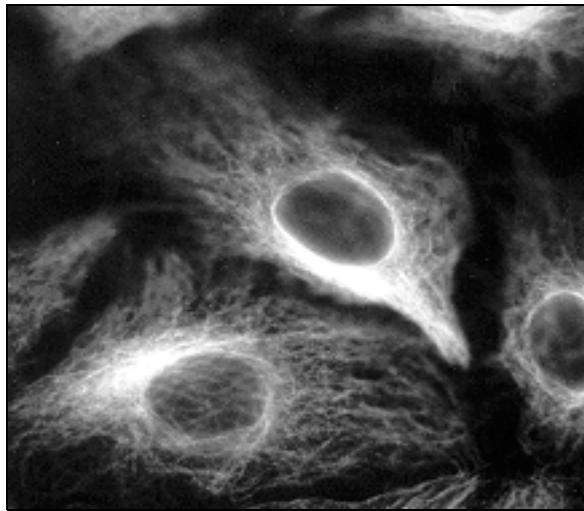
Zusammenfassend kann man sagen, daß das Mikrotubulisystem mit hoher Wahrscheinlichkeit als primäres Target des Tubulysins anzusehen ist und daß die Veränderungen der Aktinmikrofilamente ein Resultat des Zusammenbruch des Mikrotubulinetzwerkes und als eine sekundäre Wirkung zu betrachten sind. Dabei war nicht auszuschließen, daß noch weitere



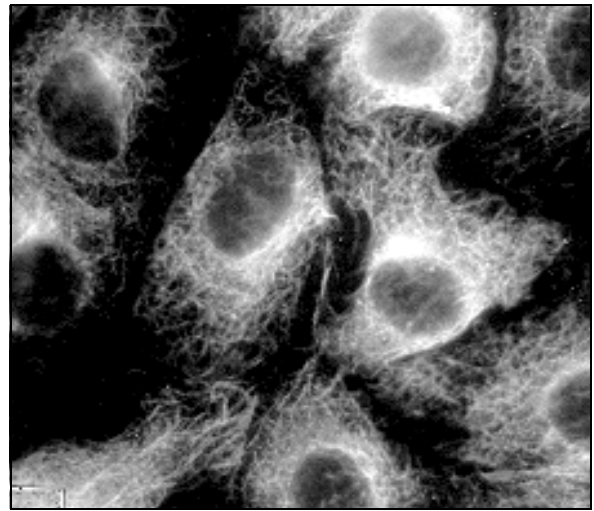
Wirkmechanismen eine Rolle spielen. Um eine sichere Aussage machen zu können, waren weitere Versuche notwendig.



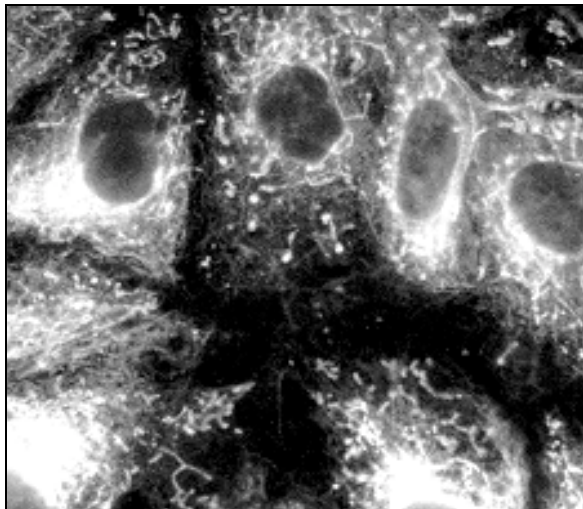
**Abb. 3.2**      **Fluoreszenzaufnahmen von Zellkernen von PtK2-Zellen (gefärbt mit DAPI), welche die Wirkung von 30 nM Tubulysin nach einer Inkubationzeit von 48 Stunden (B) im Vergleich zur einer Kontrolle (A) zeigen.**



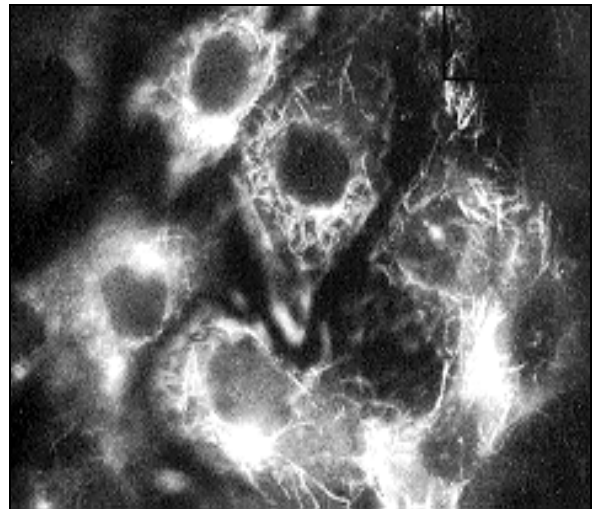
A) 0 Stunden



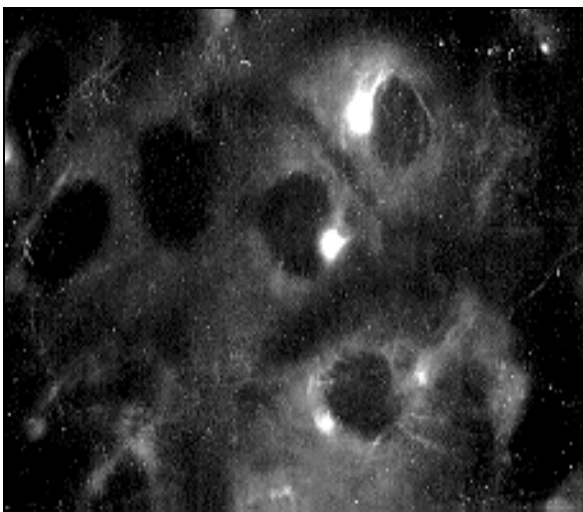
B) 2 Stunden



C) 4 Stunden



D) 6 Stunden



E) 10 Stunden

**Abb. 3.3 Immunfluoreszenzaufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen mit Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin. Die Zellen wurden mit 20 ng/ml Tubulysin behandelt und nach den angegebenen Zeiten fixiert.**

### **3.2.3 Entfernung von Tubulysin A durch Auswaschen aus PtK2-Zellen**

Mit den unter 2.8.4 beschriebenen Versuchen sollte auch überprüft werden, ob die Einwirkung des Tubulysins auf die Zellmikrotubuli permanent ist. Dazu wurde das Tubulysin aus dem Zellkulturmedium durch wiederholte Waschschrte entfernt, und die Zellen wurden zur Erholung weiter inkubiert.

Die Untersuchungen zeigten eine Depolymerisation der Mikrotubuli nach Behandlung der PtK<sub>2</sub>-Zellen mit 20 bis 25 nM Tubulysin für 24 Stunden. Bei Zellen, die nach dieser Behandlung mit Tubulysin in Tubulysin-freiem Medium für 24 und 48 Stunden inkubiert wurden, änderte sich sowohl hinsichtlich der Mikrotubuli als auch der Zellkerne nichts. Es bildeten sich keine Mikrotubuli mehr aus. Man könnte vermuten, daß das Tubulysin sehr schnell in die Zellen aufgenommen und stark an das Tubulin gebunden wird. Tatsächlich konnten auch durch mehrere Waschschrte die Tubulysin-Effekte in den Zellen nicht aufgehoben werden.

### **3.2.4 Prüfung auf additive oder synergistische Effekte von Tubulysin und Taxol**

Es sollte geprüft werden, ob sich ein Zusammenwirken mit dem ebenfalls am Tubulin bindenden, aber die Mikrotubuli stabilisierenden Taxol ergeben würde. Vorstellbar wäre, daß Taxol die Mikrotubuli trotz Gegenwart von Tubulysin stabilisiert. Möglicherweise kommt es aber zu einer Interaktion zwischen den beiden Molekülen, wodurch die Wirkung des Tubulysins verringert würde. Denkbar wäre auch, daß die beiden Moleküle unabhängig binden. Taxol wurde gegenüber dem Tubulysin in hohem Überschuß zugegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 250 nM Taxol vorbehandelt. Danach wurde 50 nM Tubulysin zugesetzt.

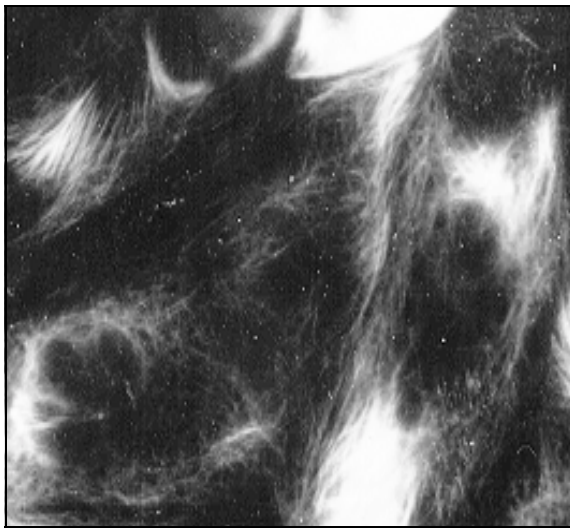
Bei der Kultur, die für 24 Stunden nur mit Taxol behandelt worden war, war das Mikrotubulinetz stark gefärbt und ähnelte dem der Kontrolle. Nach anschließender Zugabe von Tubulysin löst sich das Mikrotubulinetz auf. Ähnlich wie unter 3.2.1 beschrieben, waren die Mikrotubuli nach 8 Stunden vollständig abgebaut. Der Einfluß von Tubulysin auf die Zellmikrotubuli der mit Taxol vorbehandelten Zellen und der nicht vorbehandelten Zellen war optisch gleich. In beiden Fällen waren die Mikrotubulifilamente 24 bis 48 Stunden nach Zugabe

von Tubulysin verschwunden. In der Abbildung 3.4 D und E erkennt man die Wirkung von Tubulysin auf PtK<sub>2</sub>-Zellen, die mit Taxol für 48 Stunden vorinkubiert waren. Die Mikrotubuli waren nach achtstündiger Behandlung mit Tubulysin abgebaut.

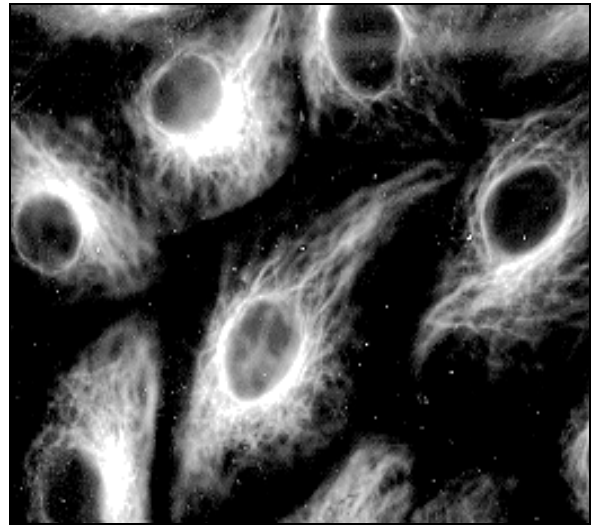
### **3.2.5 Prüfung auf additive oder synergistische Effekte von Tubulysin und Epothilon B**

Epothilon hat sowohl in vitro als auch in vivo den gleichen Mechanismus wie Taxol (Bollag et al, 1995). Es stabilisiert die Mikrotubuli und stimuliert die Tubulinpolymerisation. In diesem Versuch wurden die Zellen für 24 Stunden mit 50 nM Epothilon B vorbehandelt. Danach wurde 50 nM Tubulysin zugesetzt. Da Epothilon B wesentlich stärker als Taxol wirkt, wurden die PtK<sub>2</sub>-Zellen nur mit 50 nM Epothilon vorbehandelt. Das Ergebnis war ähnlich wie im Fall von Taxol (Abb. 3.4). Die Zellmikrotubuli wurden trotz der Anwesenheit von Epothilon durch Tubulysin depolymerisiert.

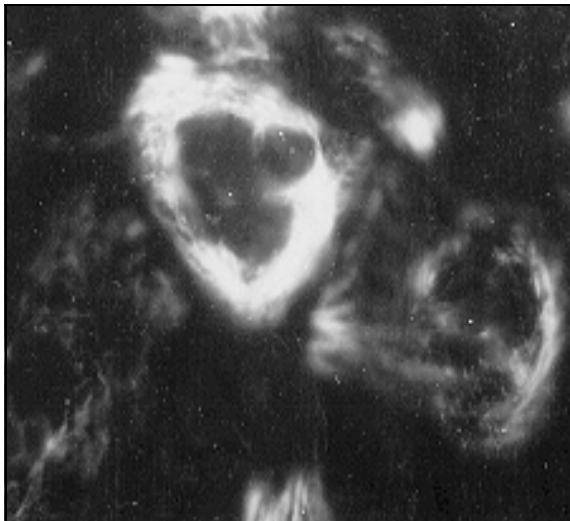
Zusammenfassend kann man sagen, daß in vivo weder Taxol noch Epothilon die Depolymerisation der Zellmikrotubuli durch Tubulysin verhindern können.



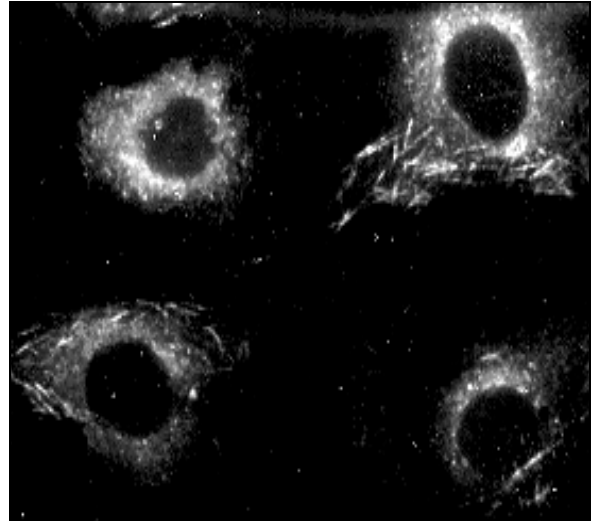
A) Epothilon B (50 nM) 72



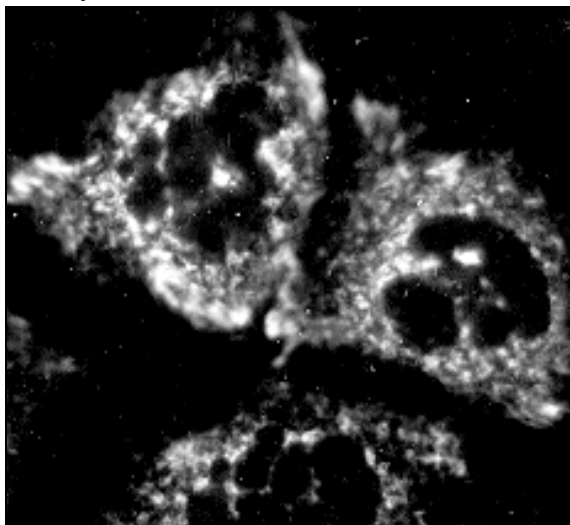
D) Taxol (250 ng/ml) 72 Stunden



B) Epothilon B (50 nM) 48 Stunden,  
Tubulysin (50 nM) 8 Stunden



E) Taxol (250 nM) 48 Stunden, Tubulysin (50  
nM) 8 Stunden



C) Epothilon B (50 nM) 48 Stunden,  
Tubulysin (50 nM) 24 Stunden

**Abb. 3.4 Immunfluoreszenzaufnahmen von  
PtK<sub>2</sub>-Zellen, markiert mit Antikörper gegen  
 $\alpha$ -Tubulin.**

### **3.2.6 Prüfung auf additive oder synergistische Effekt von Tubulysin und Vinblastin**

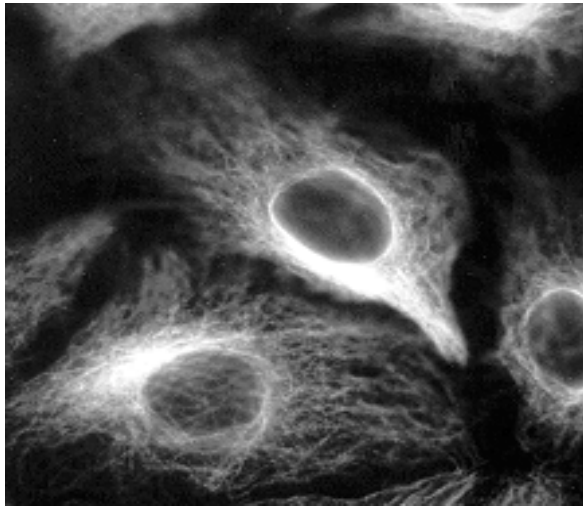
Vinblastin bindet an Tubulin und inhibiert ebenfalls die Mikrotubulibildung. Es hat eigene Bindungsstellen am Tubulin. Vorstellbar war in diesem Versuch eine Überlappung der Bindungsstellen von Tubulysin und Vinblastin am Tubulindimer. Möglicherweise konkurriert Vinblastin mit dem Tubulysin an derselben Bindungsstelle. Die Immunfluoreszenz- Untersuchung zeigte, daß die Kombination der beiden Substanzen weder zu einem additiven noch zu einem synergistischen Effekt führte. Gegenüber dem Kontrollversuch (nur Tubulysin) wurde kein Unterschied gesehen. Die Zellmikrotubuli waren nach Zugabe von 50 nM Tubulysin in weniger als 24 Stunden vollständig verschwunden, während dies nach Einwirkung von Vinblastin (250 nM) wesentlich langsamer erfolgte. Abbildung 3.5.C zeigt Fluoreszenzaufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen, die mit 250 ng/ml Vinblastin behandelt worden waren. Das Mikrotubulinetz war nach 72 stündiger Inkubation mit Vinblastin zum großen Teil noch vorhanden. Eine Kombination von Vinblastin (250 ng/ ml) und Tubulysin (50 ng/ ml) führte zu keiner über den Tubulysin Effekt hinausgehenden Wirkung (C, E).

### **3.2.7 Prüfung auf einen additiven oder synergistischen Effekt von Tubulysin und Colchicin**

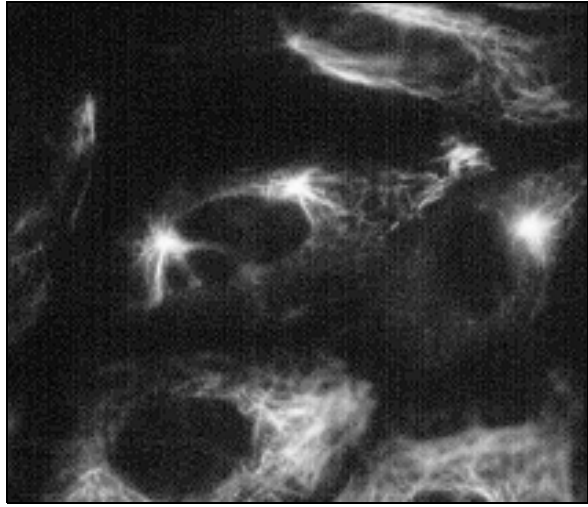
Colchicin ist eine Substanz, die durch Bindung an die Tubulineinheiten eine weitere Polymerisation blockiert. Auch hier sollte untersucht werden, ob es eine Überlappung der Bindungsstellen von Tubulysin gibt.

Bei einer Konzentration von 250 nM Colchicin (3.5 B) wurde erst nach drei Tagen eine schwache Wirkung beobachtet, die mit 50 nM Tubulysin schon in ca. 6 Stunden zu erreichen war. Die Fluoreszenzaufnahmen von mit 250 ng/ml Colchicin behandelten PtK<sub>2</sub>-Zellen (Abb. 3.5.B) zeigen, daß das Mikrotubulinetz auch nach 72 stündiger Inkubation zum großen Teil noch vorhanden war. In den Präparaten mit beiden Substanzen konnte keine verstärkte Wirkung gegenüber den Zellen, die nur mit Tubulysin behandelt wurden, beobachtet werden. Ähnlich wie mit Vinblastin, führte eine Kombination von Colchicin (250 ng/ ml) und Tubulysin (50 ng/ ml) auch zu keiner über den Tubulysin-Effekt hinausgehenden Wirkung (D).

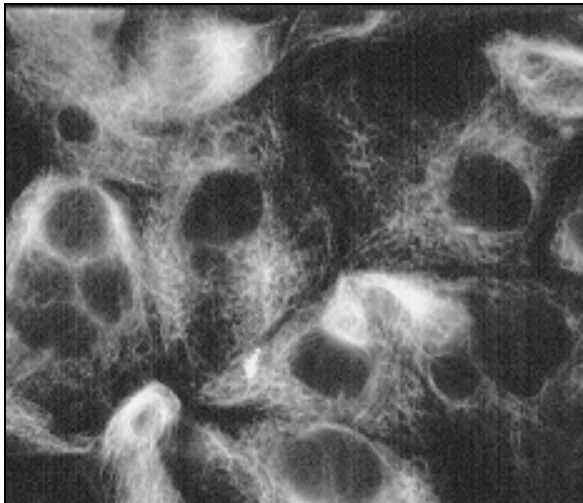




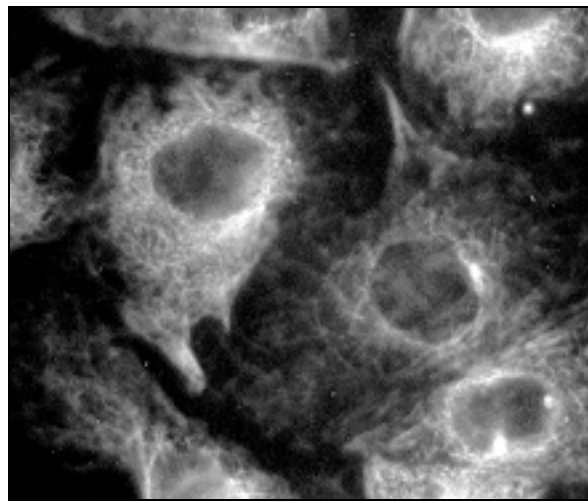
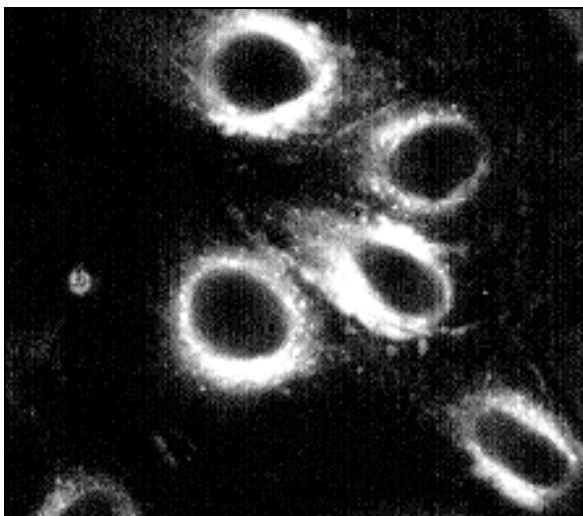
A) Kontrolle



B) Colchicin (250 ng/ ml) 72 Stunden



C) Vinblastin (250 ng/ ml) 72 Stunden

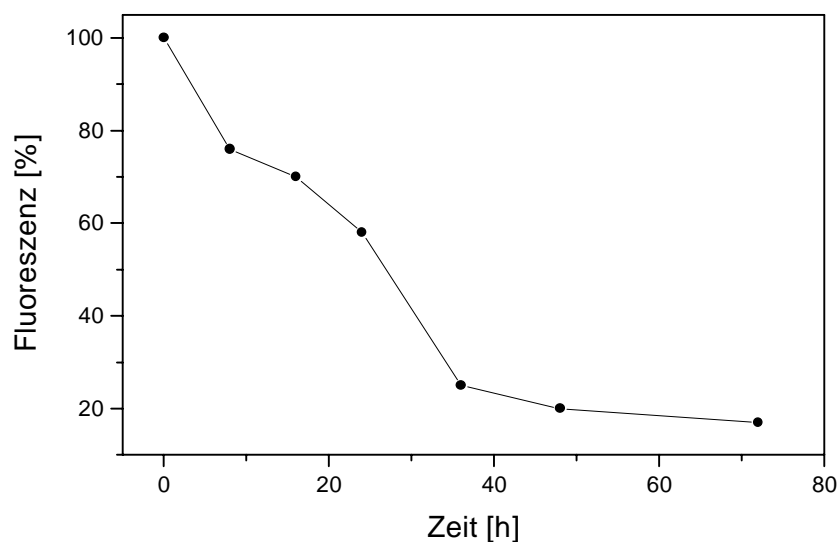
D) Colchicin (250 ng/ml), Tubulysin  
(50 ng/ml) 2 StundenE) Vinblastin (250 ng/ ml), Tubulysin 50 ng/  
ml 4 Stunden

**Abb. 3.5 Immunfluoreszenzaufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen mit Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin. Die Zellen wurden mit Tubulysin/Colchicin oder Tubulysin/Vinblastin behandelt und nach den angegebenen Zeiten fixiert.**

### 3.2.8 Immuncytofluorometrie

Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnte eine Antimikrotubuli-Wirkung des Tubulysins gezeigt werden. Durch immuncytofluorometrische Messungen ließ sich der Abbau der Mikrotubuli in Gegenwart von Tubulysin quantifizieren. Abb. 3.6 zeigt die Abnahme der Tubulinfluoreszenz in den Zellen nach Zugabe von 50 nM Tubulysin. Innerhalb von 36 Stunden erreichte die Fluoreszenz ein Minimum von 20 % des Ausgangswertes.

Weitere cytometrische Untersuchungen ergaben, daß eine Vorbehandlung der Zellen mit Epothilon B (50 nM), Taxol (250 nM), Vinblastin (250 nM) und Colchicin (250 nM) keinen meßbaren Einfluß auf die Wirkung des Tubulysins hatten.



**Abb. 3.6 Immuncytofluorometrie von PtK2-Zellen nach Behandlung mit 50 nM Tubulysin. Gemessen wurde der Gehalt an markiertem Tubulin pro Zelle.**



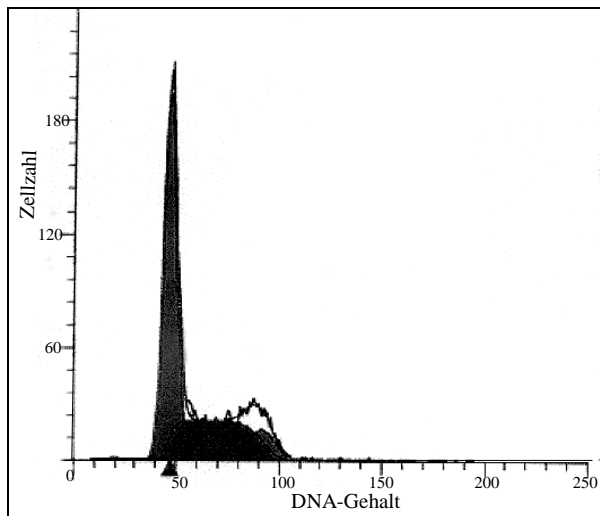
### 3.3 Einfluß von Tubulysin auf den Zellzyklus

Eukaryotische Zellen durchlaufen einen Zellzyklus. Zellen der G<sub>1</sub>-Phase haben einen einfachen DNA-Gehalt, der in der folgenden S-Phase verdoppelt wird. Zellen der anschließenden G<sub>2</sub>-Phase haben dann einen doppelten DNA-Gehalt. Nach der Mitose (M-Phase) liegen die Zellen wieder in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase vor.

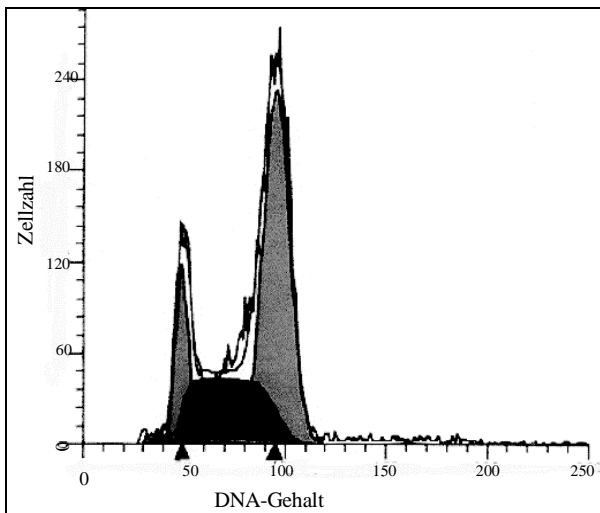
Die Wirkung des Tubulysins auf den Zellzyklus wurde mit einem Durchfluß-Cytometer untersucht (siehe 2.8.6). Das Stadium jeder Zelle wurde über die Menge des in die Zelle eingebauten Propidiumjodids bestimmt, die proportional zum DNA-Gehalt ist. Abbildung 3.7 zeigt die Einwirkung von Tubulysin auf den Zellzyklus von L929-Zellen. Mit dem Computerprogramm ModFit LT wurde der Anteil der verschiedenen Phasen in den Zellkulturen durch Auftragung der Zellzahl gegen den DNA-Gehalt ermittelt. Die Verdopplung des DNA-Gehalts der Zellen legt nahe, daß Tubulysin nur noch einen DNA-Replikationsschritt erlaubt. Abbildung 3.8 A zeigt die prozentualen Anteile von L929-Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>/M-Phase vor und nach Behandlung mit Tubulysin (50 nM). Vor der Behandlung befanden sich die meisten Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase (56 %), während in der S-Phase ca. 33% und der G<sub>2</sub>/M-Phase nur 11 % der Zellen waren (Abb.3.8 A). Nach Zugabe von Tubulysin stieg innerhalb von 24 Stunden der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase auf 56 % an. Die Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase nahmen deutlich ab. Nach 48 Stunden waren über 75% der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. Dieses Ergebnis ist durch eine Einwirkung des Tubulysins auf die Mikrotubuli erklärbar, die eine Mitose verhindert, indem der Aufbau einer Mitosespindel verhindert wird.

Die Veränderung der Phasen wurde auch an synchronisierten Zellkulturen untersucht. Die Verteilung der Zellpopulation über die einzelnen Stadien der Zellzyklus wurde nach 0, 24 und 48 Stunden bestimmt. Das Ergebnis des Synchronisationsversuchs stimmte mit dem in Abb. 3.8 A gezeigten Ergebnis überein.

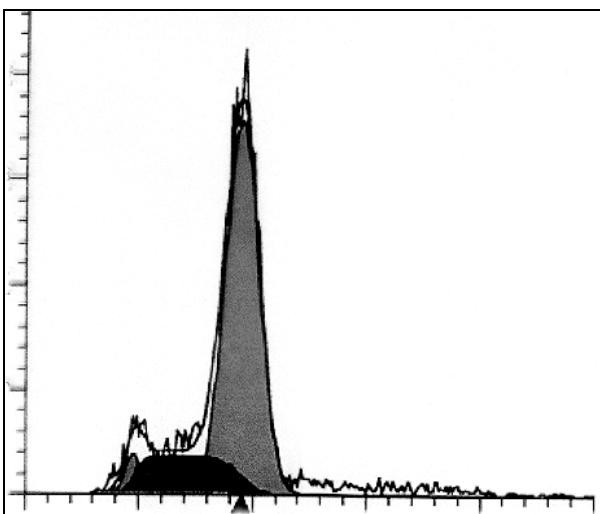
Zusammenfassend kann man sagen, daß Tubulysin eine stark antimitotisch wirkende Substanz ist. Möglicherweise spielen aber noch weitere Wirkmechanismen eine Rolle.



Kontrolle



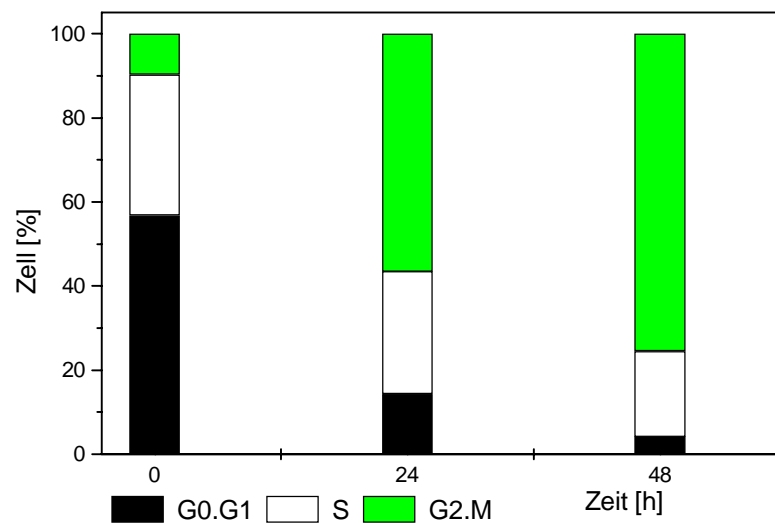
24 Stunden



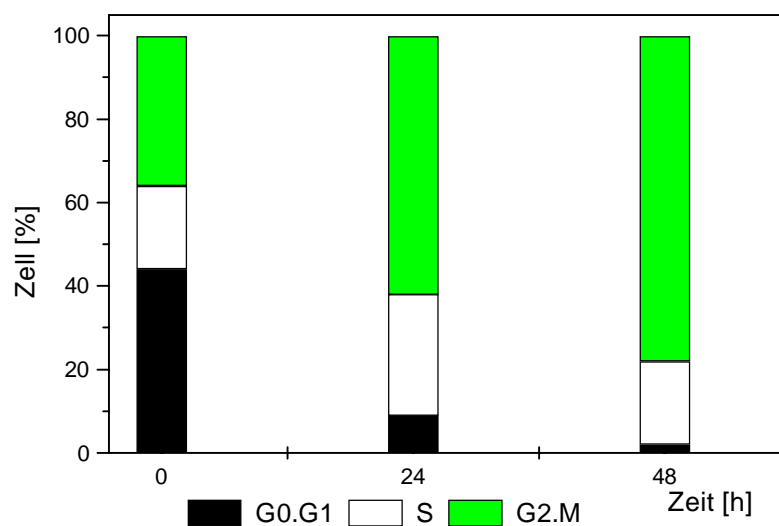
48 Stunden

**Abb. 3.7**      Einfluß von Tubulysin auf den Zellzyklus in L929 Zellen.

Die Verteilung der Zellpopulation über die einzelnen Stadien des Zellzyklus wurde nach 0 (Kontrolle), 24 und 48 Stunden bestimmt.



**Abb. 3.8 A** Ein repräsentatives Histogramm des DNA-Gehaltes zeigt die prozentualen Anteile der G0/G1-, S-, und G2/M-Phase nach Behandlung von L929-Zellen mit Tublysin (30 nM) für 24 und 48 Stunden.



**Abb. 3.8 B** Ein repräsentatives Histogramm des DNA-Gehaltes zeigt die prozentualen Anteile der G0/G1-, S-, und G2/M-Phase nach Behandlung von HL-60 Zellen mit Tublysin (30 nM) für 24 und 48 Stunden.

### **3.4 Untersuchung zur Apoptose-Induktion durch Tubulysin**

#### **3.4.1 Bestimmung des Zelltods**

Wie schon unter 3.2.1 erwähnt, haben die Immunfluoreszenz-Untersuchungen gezeigt, daß Tubulysin zur Zerteilung der Zellkerne führt. Daher wurden Versuche zum Nachweis einer Apoptose-Induktion durch Tubulysin durchgeführt. Wie unter 2.8.9.1 beschrieben, wurde der apoptotische Zelltod mittels eines ELISA photometrisch bestimmt. Dieser Versuch zeigte, daß eine Behandlung der Zellen mit Tubulysin zu biochemischen Veränderungen in der Chromatinstruktur führt. Die DNA der Zellen wurde spezifisch zwischen den Nukleosomen gespalten. Histonassoziierte DNA-Fragmente (Mono- und Oligonucleosomen) konnten durch diesen Test nachgewiesen werden.

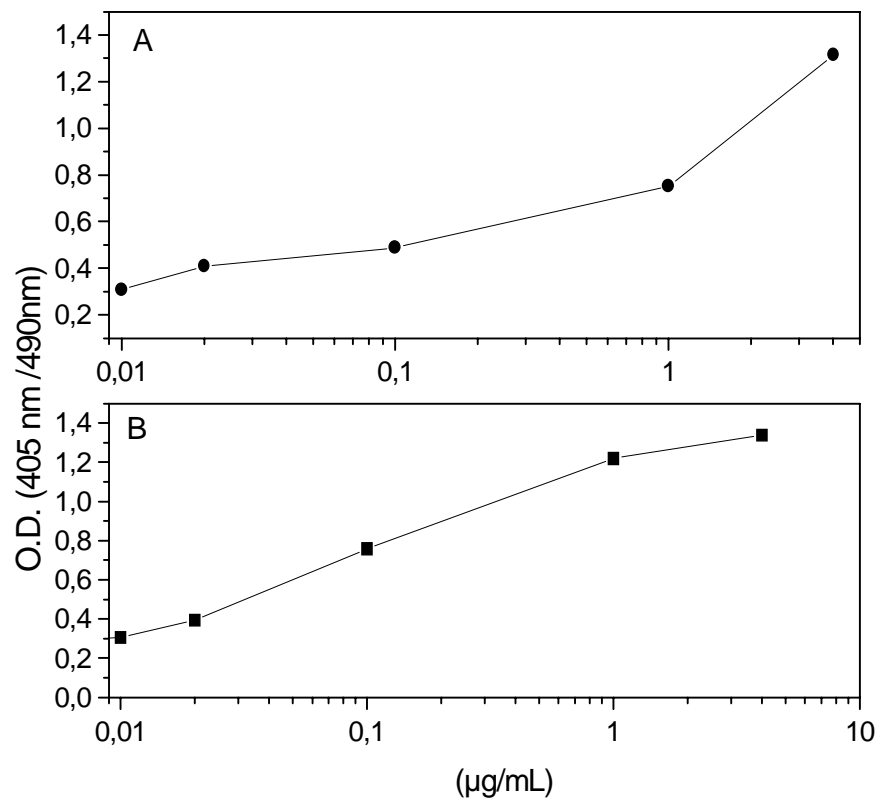
Nachdem die Zellen mit Tubulysin behandelt worden waren, wurde die Zunahme der Nukleosomen in der Cytoplasmafraktion mittels ELISA im Vergleich zu einer Kontrolle mit unbehandelten Zellen bestimmt.

Mit Camptothecin bzw. Tubulysin (Abb. 3.9 A und B) ergaben sich konzentrationsabhängig nach 6 Stunden Inkubation relativ deutliche Zunahmen an cytoplasmatischen Mono- und Oligonukleosomen.

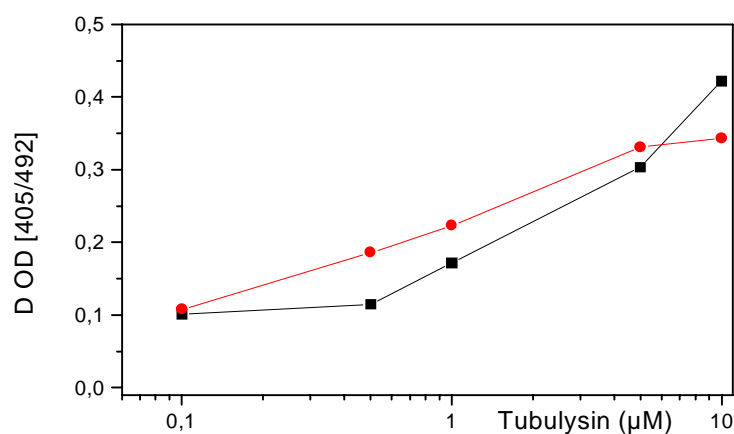
#### **3.4.2 Bestimmung der DNA-Fragmentierung**

Wie unter 2.8.9.2 beschrieben, wurden die durch Apoptose gebildeten DNA-Fragmente durch einen ELISA-Test bestimmt. Dabei wurde die DNA von U-937 Zellen (2.4.5) durch 5'-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) markiert. Danach wurden die Zellen mit Tubulysin A bzw. Tubulysin D für 6 Stunden behandelt. Die im Cytoplasma freigesetzten, mit BrdU-markierten DNA-Fragmente konnten photometrisch bestimmt werden. In Abbildung 3.10 sieht man die konzentrationsabhängige Zunahme der Extinktion, die proportional zur Zunahme der durch Apoptose fragmentierten DNA anstieg.

Zusammenfassend gelten die beiden Ergebnisse als Nachweis für eine Apoptose-Induktion durch Tubulysin.



**Abb. 3.9 Konzentrationsabhängigkeit der durchschnittlichen Nukleosomenzahl pro Zelle nach einer Behandlung mit Camptothecin (A) und Tubulysin (B).**



**Abb. 3.10 Konzentrationsabhängigkeit der relativen Zunahme der DNA-Fragmentierung als Anzeichen einer Apoptose nach Behandlung von U-937-Zellen mit Tubulysin A (■) bzw. Tubulysin D (●) für 6 Stunden.**

### **3.4.3 Bestimmung der Apoptoseleiter als Nachweis für Apoptoseinduktion durch Tubulysin**

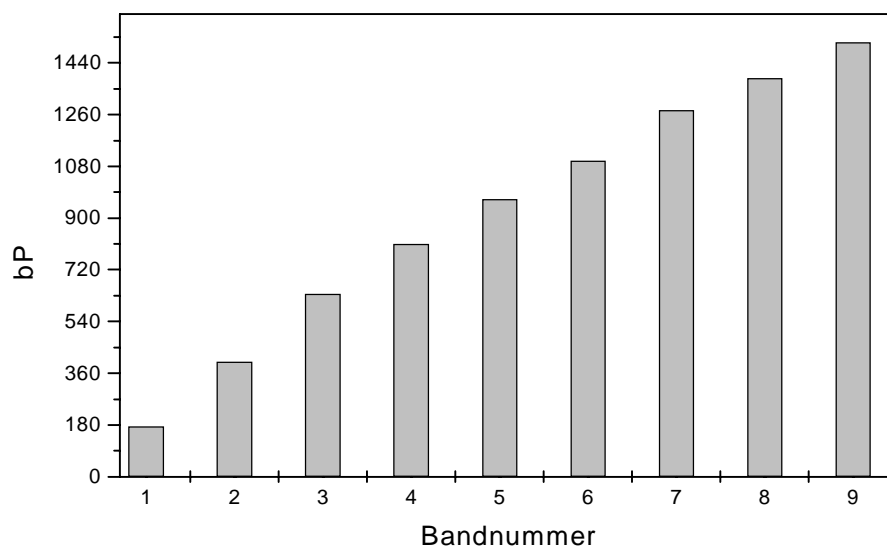
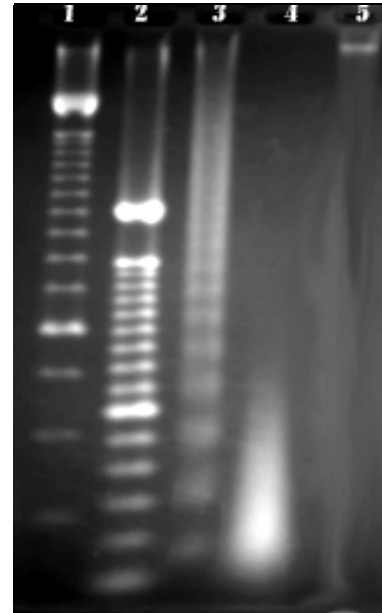
In Abbildung 3.10 ist die apoptotische Einwirkung des Tubulysins auf die DNA von Lymphoma U937-Zellen dargestellt. Die Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit 50 nM Tubulysin behandelt. Danach wurde die chromosomale DNA isoliert und elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle diente DNA, die aus unbehandelten Zellen isoliert wurde (2.8.9.3 und 2.8.9.4). Abbildung 3.11 zeigt ein Gel mit DNA-Banden, die mit Ethidiumbromid angefärbt wurden. Das Bild des Gels wurde digital gespeichert und über das Bildverarbeitungs-Programm WinCam2.1 (Cybertech) analysiert. Auf der 1. Spur von links wurde ein Standard mit einer DNA-Leiter getrennt, dessen Stufen 100 Basenpaare groß sind. Die Spur 2 zeigt eine 250-Basenpaarleiter, und auf der Spur 3 wurde isolierte DNA von U-937-Zellen getrennt, die mit 50 nM Tubulysin für 48 Stunden inkubiert worden waren. Die Analyse ergab (s. Abb. 3.11), daß die erste Band eine Größe zwischen 160 und 180 Basenpaare hatte. Das entspricht der Größe eines Nukleosoms. Die zweite war ungefähr zweimal so groß, die dritte drei mal u.s.w. Die Größe der Banden steigt linear. Eine solche DNA-Leiter ist charakteristisch für eine Apoptose, die sich darin von der zweiten Art des Zelltodes, der Nekrose unterscheidet.

Spur 4 zeigt eine einzige verschmierte große DNA-Bande. Diese DNA wurde aus Zellen isoliert, die für 24 Stunden mit Tubulysin inkubiert worden waren. Das Laufverhalten dieser Bande läßt sich nicht erklären. Vermutlich handelt es sich um einen Fehler.

Spur 5 zeigt DNA aus unbehandelten Zellen. Hier sieht man nur eine einzelne Bande, die sehr weit oben direkt unter der Geltasche liegt. Dabei handelt es sich um ungespaltete chromosomale DNA.

In Abbildung 3.12 wurde die Größe der DNA-Fragmente in der Reihenfolge der Banden graphisch dargestellt. Dabei erkennt man die regelmäßige Größenzunahme der DNA-Fragmente, wie sie bei einer Apoptoseleiter zu erwarten ist.

**Abb. 3.11** Auftrennung der chromosomalen DNA von U-937 Zellen mittels Agarosegelelektrophorese. Spur 1 und 2: 100 bzw. 250 bP-DNA-Marker; Spur 3 und 4: DNA der mit 50 nM Tubulysin A für 24 bzw. 48 Stunden behandelten Zellen, Spur 5: DNA der Kontrolle.



**Abb. 3.12** Auftrennung der chromosomalen DNA von U-937 Zellen mittels Agarosegelelektrophorese nach Behandlung der Zellen mit Tubulysin (50 nM, 48 Std). Die Darstellung zeigt die regelmäßige Größenzunahme der einzelnen DNA-Banden.

## **4            *In vitro*-Ergebnisse**

### **4.1            Reinigung und Qualität von Tubulin aus Schweinehirn**

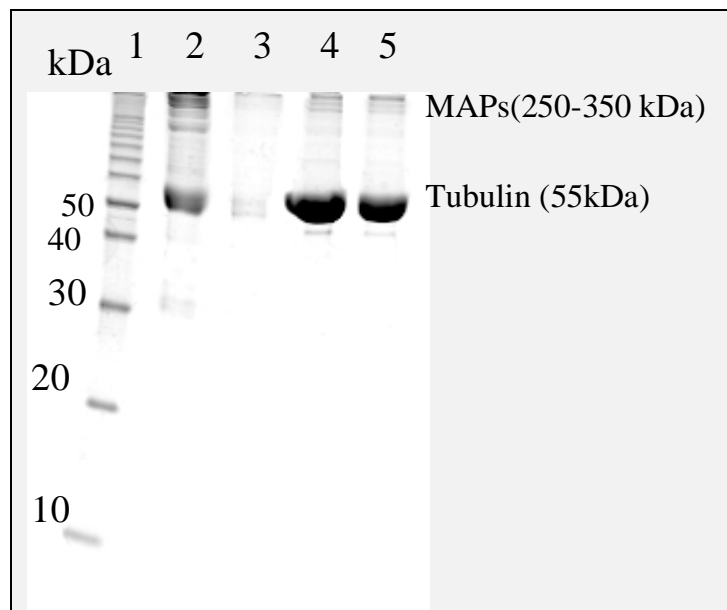
Für die verschiedenen Versuche wurde Mikrotubuliprotein wie in Material und Methoden beschrieben aus dem Hirn adulter Schweine nach Shelanski et al. (1973) und Vallee (1986) gereinigt und eingesetzt. Die Reinigung erfolgte mit und ohne Epothilon B (2.9.1 bzw. 2.9.2). Die Reinheit wurde nach jedem Polymerisationszyklus mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) überprüft und die Reinigung solange fortgesetzt, bis das Tubulinprotein im Gel als ein Einzelband bei etwa 55 kDa erschien (Abb. 3.13). Eine Auflösung in zwei Banden ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten) könnte durch Zugabe von Harnstoff erreicht werden. Neben dem Tubulin waren Banden erkennbar, bei denen es sich wahrscheinlich um HMW-MAPs (250-350 kDa) handelte. Die Reinheit der Mikrotubuli wurde auch durch Betrachtung von Mikrotubuli nach Negativkontrastierung im Elektronenmikroskop überprüft (Abb. 3.14). Die gesamte Menge des Mikrotubuliproteins war zwischen 120 und 150 mg pro 600 g Schweinehirn, d.h. eine Ausbeute von 0,2 und 0,25 mg pro Gramm Schweinehirn.

### **4.2            Einfluß von Epothilon auf die Ausbeute an Mikrotubuli-proteinen**

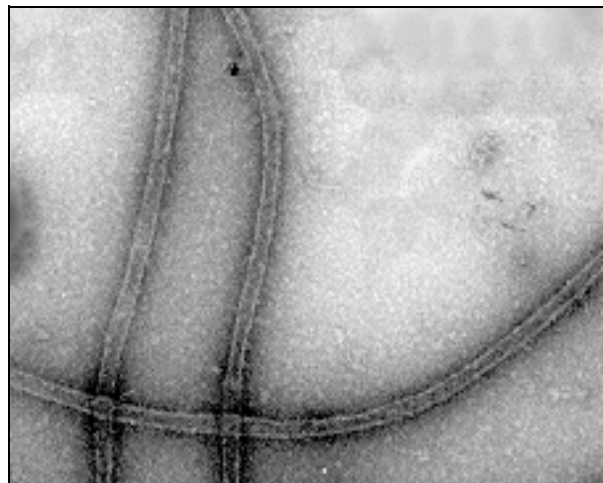
Eine Zugabe von Epothilon B in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  während des ersten Polymerisationszyklus führte zu einer Steigerung der Mikrotubuliprotein-Ausbeute um ca. 35 % (0,27- 0,33 mg pro Gramm Schweinehirn). Nicht gebundenes Epothilon wurde im nächsten Schritt ausgewaschen. Die Qualität des in Gegenwart von Epothilon isolierten Mikrotubuliproteins unterschied sich nicht von dem, welches ohne Verwendung von Epothilon gereinigt wurde.

Durch Ionenaustauschchromatographie über Phosphocellulose P-11 (Whatmann) wurde Tubulin (PC-Tubulin) erhalten, das von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) frei ist (Weingarten et. al., 1975; Berkowitz et. al., 1977; siehe 2.9.2).





**Abb. 3.13** Vergleich verschiedener Tubulin-Reinigungsschritte mittels PAGE. (1) Proteinstandard; (2) Tubulin-Präparation nach dem ersten Polymerisationszyklus; (3) Überstand nach dem ersten Zyklus; (4) Tubulin nach dem zweiten Zyklus; (5) dem dritten Zyklus.



**Abb. 3.14** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Mikrotubuli nach einer Polymerisation *in vitro* in PEM-Puffer bei 37 °C (Negativkontrastierung mit Uranylacetat).

## **4.3 Messungen der Tubulinpolymerisation *in vitro***

### **4.3.1 Vorbereitung der Tubulin-Präparate**

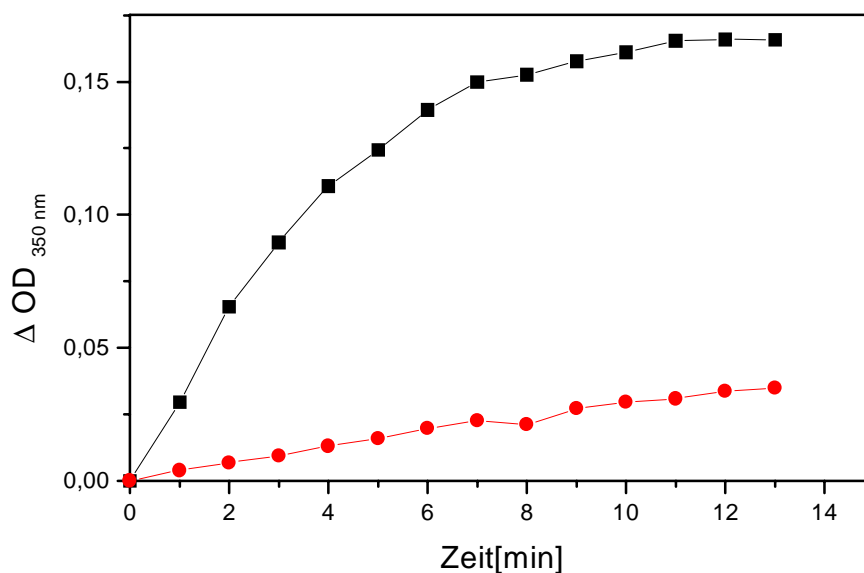
Bei der Resuspension der eingefrorenen Pellets wurde versucht, Lösungen mit konstantem Tubulingehalt herzustellen. Ziel war es, eine größtmögliche Konstanz in den Versuchen zu gewährleisten, also dieselben Absorptionswerte für zwei getrennte Messungen unter identischen experimentellen Bedingungen zu erhalten. Letztendlich wurde diese Genauigkeit nicht erreicht. Gründe dafür liegen in der Ungenauigkeit der Proteinbestimmung und dem Aktivitätsabfall des Tubulins (Nach 5-stündiger Inkubation auf Eis nahm die nach 20 Minuten erreichte Absorption um 4 %) ab. Deswegen wurden die Messungen immer auf die wirkstofffreie Kontrolle bezogen. Die Proben wurden bis zur Messung immer auf Eis inkubiert. In einigen Versuchen wurde PEM-Puffer mit hoher Glutamatkonzentration (0,8 M) für die Polymerisation von MAP-freiem Tubulin verwendet, da Glutamat in höheren Konzentrationen die Eigenschaft besitzt, das Tubulinprotein zu stabilisieren (Hamel und Lin, 1981).

### **4.3.2 Auswahl der Methode**

In dieser Arbeit wurde für die Verfolgung der Tubulinpolymerisation die Turbidimetrie als Methode ausgewählt. Für diese Methode sprachen der geringe Aufwand, was vor allem bei Serienmessungen wichtig war, und die relativ kleinen Proteinmengen, die benötigt wurden. Ein weiterer Vorteil ist, daß der Verlauf der Reaktion ohne Eingriff in das System kontinuierlich verfolgt werden kann. Daher ist Turbidimetrie das vorherrschende Meßverfahren in allen Arbeiten, die sich mit der Wirkung von Substanzen auf die Tubulinpolymerisation befassen (Gaskin, 1982). Die turbidimetrischen Messungen werden normalerweise bei 350 nm durchgeführt, da bei dieser Wellenlänge die MAPs keine Eigenabsorption zeigen (Gaskin, 1982). Nach Zugabe von GTP in einer Konzentration von 1 mM wurde die Reaktion durch Erhöhung der Temperatur gestartet, und die Absorptionsänderung gegen die Zeit aufgenommen.

### 4.3.3 Tubulinpolymerisation in Gegenwart von Tubulysin

Im Idealfall sollte man in einer Tubulinpolymerisationskurve eine relativ kurze Anfangs- oder Nukleationsphase erkennen, in der kaum eine Zunahme der Polymerisation gemessen wird. Danach steigt die Absorption exponentiell an und geht in die lineare Elongationsphase über. Schließlich wird dann die stationäre oder Gleichgewichtsphase erreicht, in der die Meßwerte bis zur Erschöpfung des vorhandenen GTPs konstant bleiben. In Abbildung 3.15 ist die Nukleationsphase kaum zu erkennen. Die Kurve steigt rasch bis zum Erreichen der stationären Gleichgewichtsphase nach 11 min an. Nach Zusatz von Tubulysin war die Polymerisation nun deutlich gehemmt, und das Plateau wurde bereits bei einer niedrigeren Absorption erreicht. Damit konnte aber noch keine Aussage gemacht werden, wie die inhibierende Wirkung erfolgte. Die Hemmwirkung des Tubulysins auf die Tubulinpolymerisation wurde deshalb weiter charakterisiert.



**Abb. 3.15** Temperaturinduzierte Polymerisation von Tubulin (1,8 mg/ml). Die Grafik zeigt die Wirkung von Tubulysin (2  $\mu$ M; ●) auf die Polymerisation von Schweinehirntubulin im Vergleich zur Kontrolle (■).

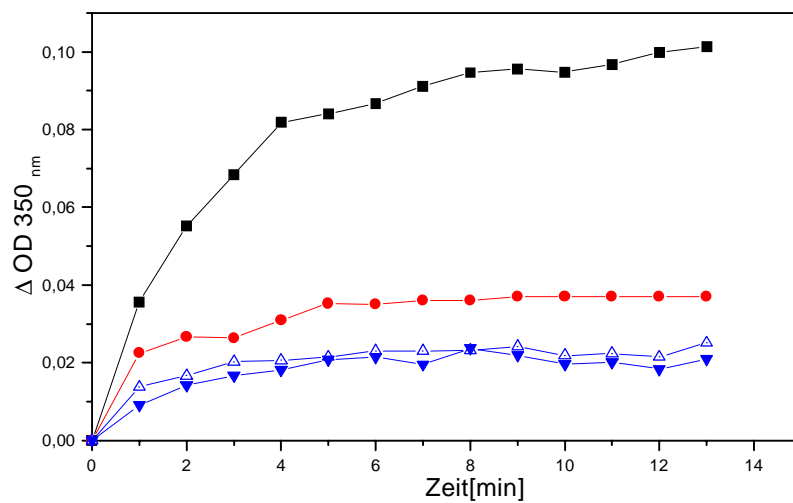
#### 4.3.4 Quantifizierung der Hemmwirkung von Tubulysin

Zunächst wurde der Einfluß verschiedener Tubulysin-Konzentrationen auf die Tubulinpolymerisation untersucht und ein  $IC_{50}$ -Wert bestimmt. Dieser Wert gibt eine Konzentration von Tubulysin an, die eine Polymerisation einer definierten Tubulin-Konzentration zu 50 % hemmt.

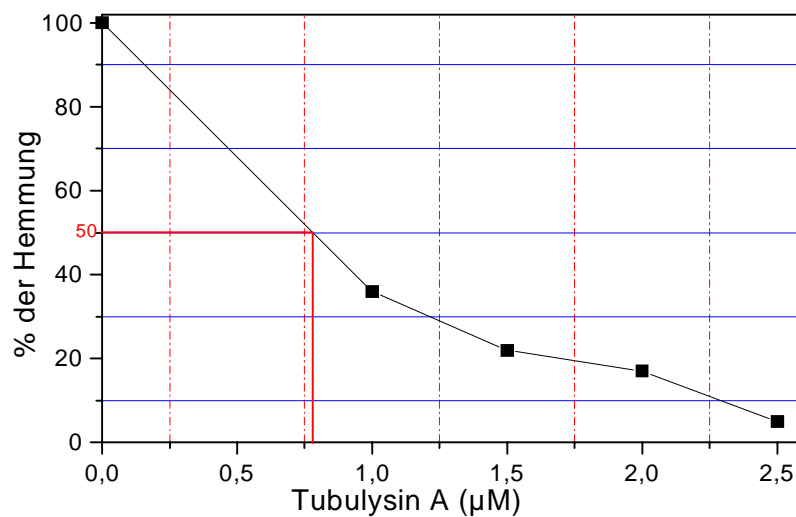
Prinzipiell wurden alle Messungen zur Untersuchung der Wirkung von Tubulysin auf die Tubulinpolymerisation mit Tubulin-Konzentrationen von 10 bis 14  $\mu M$  durchgeführt. In diesem Konzentrationsbereich lag die Polymerisationsgeschwindigkeit in einem optimalen Bereich. Die maximalen Werte der Polymerisationskurven ändern sich mit den Versuchsbedingungen, wie Konzentration, Reinheitsstufe und Alter des Tubulins.

Bei Zugabe verschiedener Tubulysin-Konzentrationen (0 bis 2  $\mu M$ ) konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Tubulysin festgestellt werden. In Abbildung 3.16 ist die Polymerisationshemmung durch 1, 1,5 und 2  $\mu M$  Tubulysin dargestellt. Mit 1,5  $\mu M$  wurde hier eine maximale Hemmung erreicht. Sie betrug 80 %. Eine 50 %ige Hemmung der Polymerisation von 10  $\mu M$  Tubulin wird bei einer Tubulysin-Konzentration von 0,75  $\mu M$  erreicht.

Für die Berechnung des  $IC_{50}$ -Werts wurden in Abbildung 3.17 die maximalen Hemmwerte der Polymerisation bei unterschiedlichen Tubulysinkonzentrationen in Prozent der Kontrolle aufgetragen. Wichtig war, daß eine Vorinkubation der Tubulin-Tubulysinmischung auf Eis von ca. 5 min vor dem Reaktionsstart großen Einfluß auf die  $IC_{50}$  hatte. Die Einführung des Reaktionsansatzes ohne Vorinkubation in die warme Küvette führte zu einer relativen Reduzierung der Hemmwirkung des Tubulysins, d.h. der  $IC_{50}$ -Wert stieg an. Die  $IC_{50}$ -Werte änderten sich bei Änderung der Tubulinkonzentration, der Konzentrationen von GTP und  $Mg^{2+}$  und mit dem Alter des Tubulins. Die angegebenen Werte wurden mit 1,25 mg/ml Mikrotubuliprotein (10  $\mu M$ ) in PEM-Puffer und 1 mM GTP (2.2) gemessen. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt, daß die Abweichung zwischen zwei unabhängigen Versuchswiederholungen maximal 10 % betrug. Die Ergebnisse, die mit diesem Tubulinpolymerisationstest gewonnen wurden, waren gut reproduzierbar.



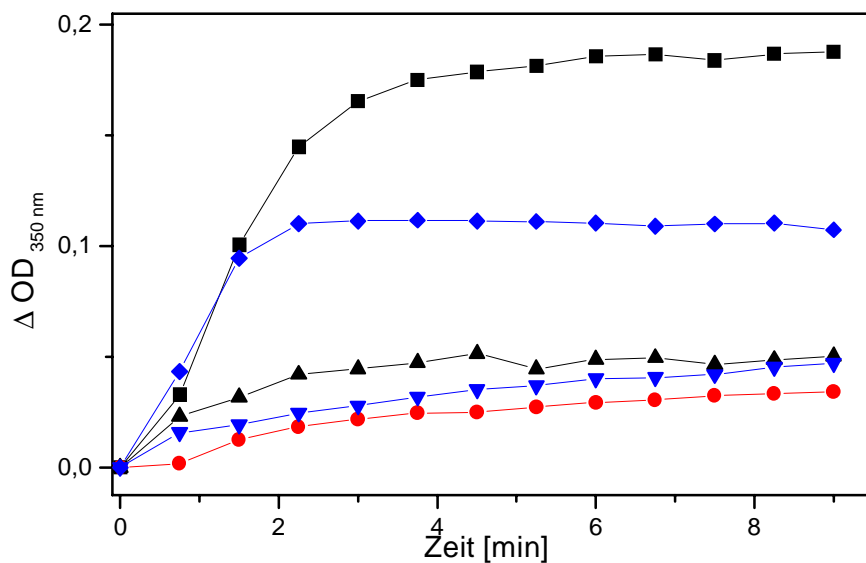
**Abb. 3.16** Die Wirkung verschiedener Tubulysin-Konzentrationen auf die Polymerisation von Tubulin (10  $\mu$ M). Kontrolle (■), 1  $\mu$ M (●), 1,5 ( $\Delta$ ) und 2  $\mu$ M (▼) Tubulysin.



**Abb. 3.17** Quantifizierung der Hemmwirkung von Tubulysin. 10  $\mu$ M Tubulin wurde mit verschiedenen Tubulysin-Konzentrationen (0-4  $\mu$ M) bei 37 °C inkubiert. Der  $IC_{50}$ -Wert wurde nach Auftragung der prozentualen Hemmung gegen die Tubulysinkonzentrationen bestimmt.

#### **4.3.5 Die Wirkung des Tubulysins im Vergleich mit anderen antimitotischen Wirkstoffen**

Um eine Vorstellung vom Wirkungsmechanismus des Tubulysins zu gewinnen und eine möglichst quantitative Aussage über die Wirkung von Tubulysin machen zu können, wurde seine Wirkung mit der von bekannten polymerisationshemmenden Substanzen, wie Colchicin, Vinblastin und Phomopsin A verglichen. Die Hemmung der Polymerisation durch 2  $\mu\text{M}$  Tubulysin A wurde mit der von 4  $\mu\text{M}$  Colchicin, 4  $\mu\text{M}$  Vinblastin und 2  $\mu\text{M}$  Phomopsin A verglichen. Die Hemmstoffe wurden mit 1,2 mg/ml Mikrotubuliprotein für 5 min auf Eis vorinkubiert und die Tubulinpolymerisation dann bei 37 °C (2.9.6.2) photometrisch verfolgt. Beim Vergleich der Hemmwirkungen, die in Abbildung 3.18 dargestellt sind, waren Tubulysin und Phomopsin A die potentesten Hemmstoffe und Colchicin der schwächste. Tubulysin ist bei einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  ungefähr so wirksam wie Vinblastin mit 4  $\mu\text{M}$ . Zusammenfassend kann man sagen, daß auch nach den *in vitro* Ergebnissen das Tubulinsystem mit höchster Wahrscheinlichkeit der primäre Wirkort des Tubulysins ist.



**Abb. 3.18** Tubulinpolymerisation (1,2 mg/ml) in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe. Kontrolle (■), 2  $\mu$ M Tubulysin A (●), 4  $\mu$ M Colchicin (◆), 2  $\mu$ M Phomopsin A (▲), 4  $\mu$ M Vinblastin (▼).

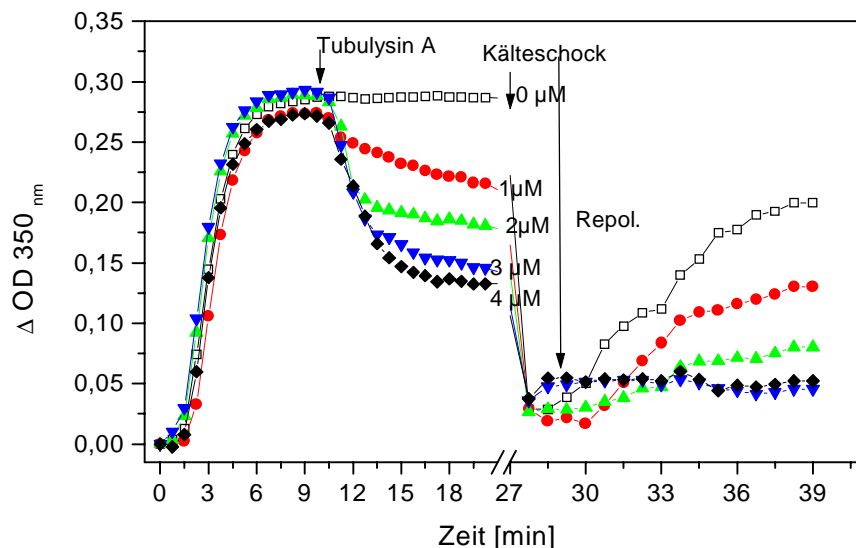
#### 4.3.6 Depolymerisation von Mikrotubuli durch Tubulysin

Nachdem eine Polymerisationshemmwirkung des Tubulysins erwiesen war, sollte geprüft werden, ob bereits polymerisierte Mikrotubuli durch Tubulysin depolymerisiert würden. Im Versuch 2.9.6.3 wurde der Polymerisationsverlauf von 12  $\mu$ M Tubulin in 4 Küvetten in 4 aufeinander folgenden Test-Phasen jeweils 10 Minuten lang verfolgt.

In der ersten Polymerisationsphase polymerisierte 12  $\mu$ M Tubulin in 4 verschiedenen Küvetten parallel bis zum Gleichgewicht. In der zweiten Phase wurde die Einwirkung von 1, 2, 3 bzw. 4  $\mu$ M Tubulysin auf den Polymerisationsverlauf verfolgt. In der dritten Phase lagen die Ansätze 5 Minuten lang auf Eis. In der vierten Phase wurden die Ansätze erneut auf 37 °C erwärmt (Abb. 3.19).

Die Kurven zeigen, daß die Tubulinpolymerisation in den ersten Minuten maximal war und schon nach 7 Minuten ins Fließgleichgewicht überging. Die Zugabe des Tubulysins führte dann zu einer beschleunigten Depolymerisation der Mikrotubuli. Die optische Dichte nahm bei 4  $\mu$ M um mehr

als 60 % ab. Durch einen Kälteschock in der dritten Phase wurde in allen Küvetten eine fast vollständige Depolymerisation erzielt. Nach Erwärmung der Ansätze fand bei einer Konzentrationen von 2, 3, oder 4  $\mu\text{M}$  Tubulysin kaum noch eine Polymerisation statt. Eine leichte Polymerisation wurde bei 1  $\mu\text{M}$  beobachtet.



**Abb. 3.19** Einfluß verschiedener Tubulysin A-Konzentrationen auf die *in vitro* Depolymerisation der Mikrotubuli (1,5 mg/ml). Die angegebenen Konzentrationen von Tubulysin A wurden nach 10 min zugegeben. Nach 21 min wurden die Küvetten für 5 min auf Eis inkubiert (Kälteschock), danach wieder auf 37°C erwärmt und weiter vermessen (Repolymerisation).

#### 4.3.7 Hemmung der Tubulinpolymerisation durch Tubulysin A in Anwesenheit von Taxol

Taxol induziert die Polymerisation von Tubulin in Abwesenheit von GTP, MAPs und bei niedrigen Temperaturen. Außerdem induziert Taxol die Polymerisation in Gegenwart von Colchicin oder Vinblastin und stabilisiert die Mikrotubuli. Die stabilisierende Wirkung von Taxol

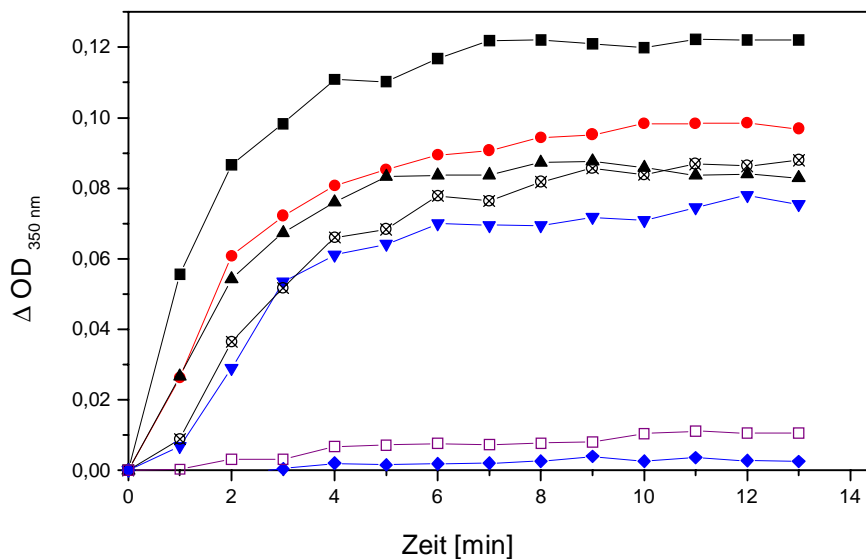


ist in der Lage, die destabilisierenden Wirkungen von Colchicin und Vinblastin aufzuheben (Howard und Timashiff, 1988). Die Frage war, ob dieses Verhalten von Taxol auch in Gegenwart von Tubulysin gilt.

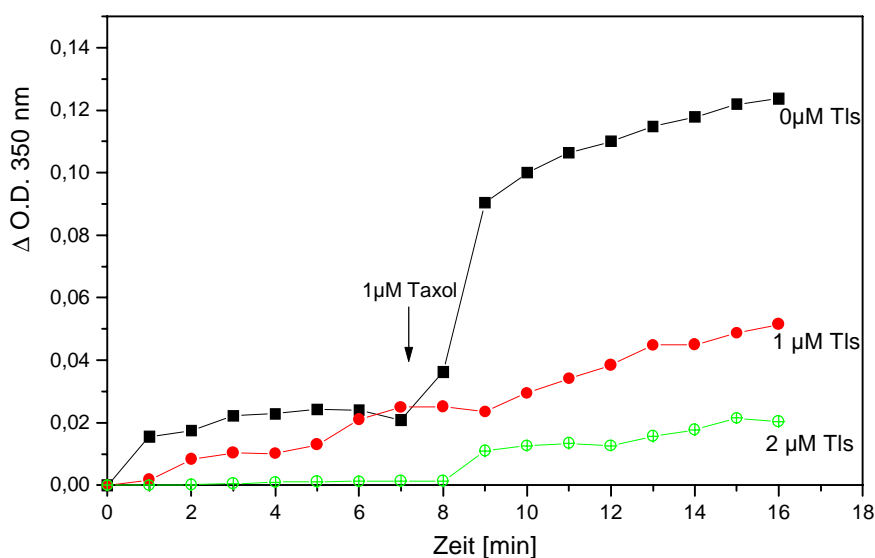
Bei einer Konzentration von 6  $\mu\text{M}$  (0,75 mg/ml) polymerisiert Tubulin nur in Anwesenheit von Taxol. Die Wirkung von Tubulysin auf eine solche durch Taxol induzierte Polymerisation sollte geprüft werden. Tubulysinkonzentrationen zwischen 1 und 5  $\mu\text{M}$  wurden zu einer 1  $\mu\text{M}$  Taxol-Tubulin-Mischung gegeben.

Wie aus Abbildung 3.20 hervorgeht lief die Polymerisation von Tubulin nicht mit gleichförmiger Geschwindigkeit ab. Bei der Kontrollreaktion (Tubulin + Taxol) erfolgte eine schnelle Tubulin-Polymerisation, und die Reaktion erreichte die maximale Absorption schon nach 5 min. Diese blieb bis zum Ende der Reaktion konstant. Nach Einsatz verschiedener Tubulysin-Konzentrationen wurde eine konzentrationsabhängige Polymerisationshemmung in Anwesenheit von Taxol festgestellt. Eine vollständige Hemmung erreichte man mit 4  $\mu\text{M}$  Tubulysin. Als Ergebnis dieses Versuchs kann man festhalten, daß die stabilisierende Wirkung von Taxol durch die inhibierende Wirkung von Tubulysin aufgehoben wird.

In einem weiteren Versuch (Abbildung 3.21) wurde die Reaktion ohne Taxol gestartet. In diesem Fall war eine geringe Polymerisation festzustellen. Die Absorption bei der Kontrolle nahm nur in den ersten Minuten leicht zu und blieb danach konstant. In Gegenwart von Tubulysin war auch diese leichte Polymerisation gehemmt. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Taxol stieg die Absorption in der Kontrolle sofort steil an, während sie in den Ansätzen mit Tubulysin nur unwesentlich zunahm. Dieser Versuch zeigte, daß Tubulysin die Induktion der Tubulinpolymerisation durch Taxol verhindert.



**Abb. 3.20** Wirkung von Tubulysin auf eine Taxol-induzierte Tubulin-Polymerisation. Die Tubulin (0,75 mg/ml) -Taxol (1  $\mu$ M) Ansätze wurde ohne (■) oder mit 1 (●), 1,5 (▲), 2 (⊗), 2,5 (▼), 4 (◆) und 5  $\mu$ M (□) Tubulysin bei 37 °C inkubiert.

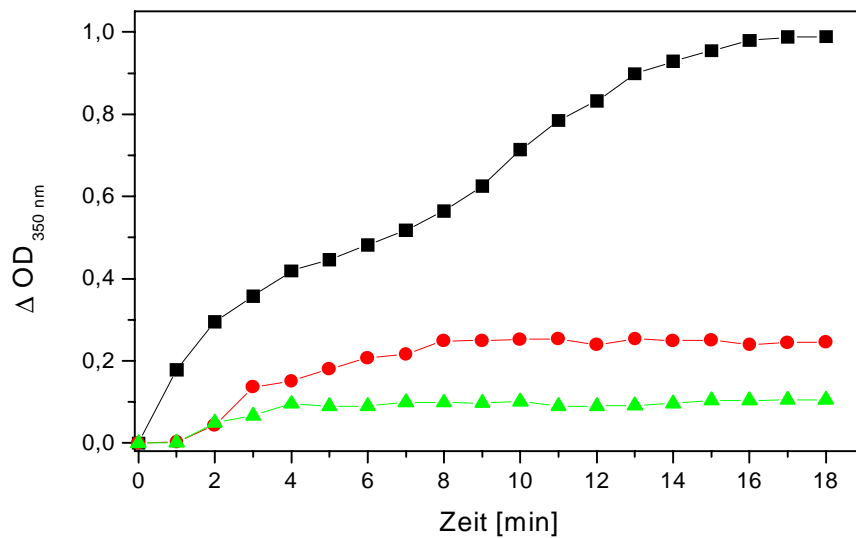


**Abb.3.21** Einfluß von Tubulysin auf eine durch Taxol induzierte Tubulinpolymerisation. Die Tubulinansätze (je 0,75 mg/ml) wurden ohne (■), mit 1  $\mu$ M (●) oder 2  $\mu$ M (⊕) Tubulysin bei 37 °C inkubiert. Nach der angegebenen Zeit (Pfeil) wurde 1  $\mu$ M Taxol zugegeben.

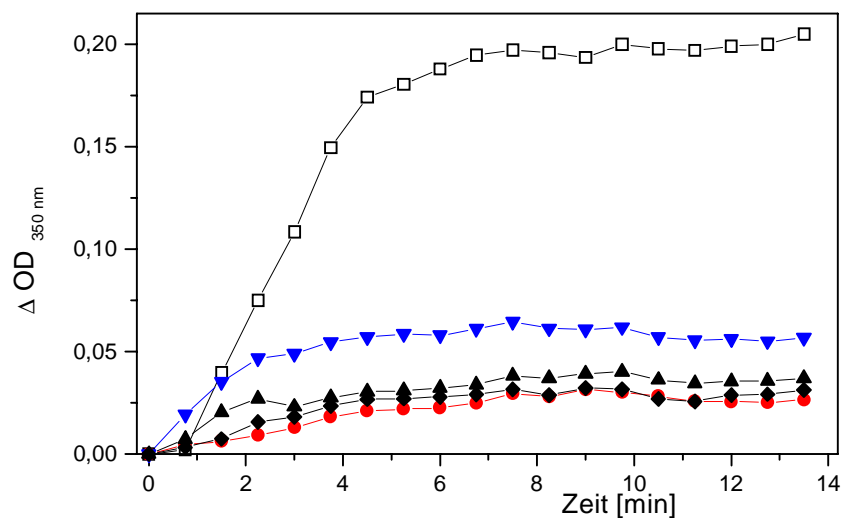
#### **4.3.8 Hemmung der Tubulinpolymerisation durch Tubulysin in Anwesenheit von Epothilon**

Epothilon wurde aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert und als zytotoxisch und antifungisch charakterisiert (Höfle et al., 1993; Gerth et al., 1996). Bollag et al. (1995) beobachteten eine antimitotische Aktivität der Epothilone A (Epo A) und B (Epo B) und stellten die ersten Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus vor. *In vitro* induziert Epothilon wie Taxol die Polymerisation von Tubulin in Abwesenheit von GTP und konkurriert mit Taxol um die Bindung an Tubulin. Die Epothilone verfügen damit über den gleichen Wirkungsmechanismus wie Taxol. Sie sind jedoch stärker wirksam gegenüber Cytostatika-resistenten Tumorzellen. Im Bereich Naturstoffe der GBF in Braunschweig wurden bisher sechs Epothilone (A-F) aus *Sorangium cellulosum* isoliert.

Ähnlich wie mit Taxol kann Tubulin in niedriger Konzentration (0,75 mg/ml) in Anwesenheit von Epothilon (Epo B oder Epo F) polymerisieren s. Abb. 3.22. Die Wirkung von Tubulysin auf eine solche durch Epothilon induzierte Polymerisation wurde ebenfalls geprüft. Abbildung 3.22 zeigt, daß Tubulysin die Tubulinpolymerisation in Anwesenheit von Epothilon verhindert kann. Die Absorption in der Kontrolle nahm zu, während sie mit 1 oder 2  $\mu\text{M}$  Tubulysin gehemmt war. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß von Taxol, Epothilon B und Epothilon F auf die Tubulinpolymerisation in Gegenwart von Tubulysin verglichen. Tubulinansätze (1,5 mg/ml) wurden mit 3  $\mu\text{M}$  Tubulysin vermischt, danach wurden den Mischungen 1  $\mu\text{M}$  Taxol, Epo B oder Epo F zugegeben. Abbildung 3.23 zeigt eine Zunahme der Absorption in der Kontrolle (ohne Tubulysin und ohne Taxol). Die Polymerisation in Anwesenheit von Tubulysin, Tubulysin/Epo B oder Tubulysin/Taxol war vollständig gehemmt. Nur im Ansatz mit Tubulysin/Epo F war eine leichte Absorptionszunahme zu erkennen.



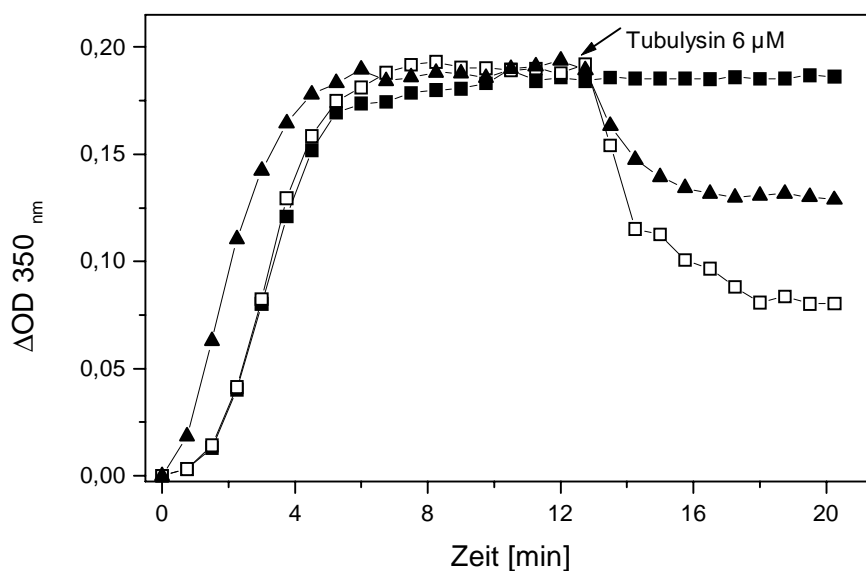
**Abb. 3.22** Die Wirkung von Tubulysin auf eine Epothilon-induzierte Tubulinpolymerisation. Die Tubulin (0,75 mg/ml)-Epo B (1  $\mu$ M) Ansätze wurde ohne (■), mit 1 (●) oder 2  $\mu$ M (▲) Tubulysin bei 37 °C inkubiert.



**Abb. 3.23** Aufhebung der Wirkung von Epothilone und Taxol (je 1  $\mu$ M) durch 3  $\mu$ M Tubulysin. Die Polymerisation von 1,5 mg/ml Tubulin ohne Hemmungstoffe (□), mit Tubulysin (●); Tubulysin/Taxol (◆); Tubulysin/Epo F (▼) oder Tubulysin/ Epo B (▲) wurde verfolgt.

### 4.3.9 Depolymerisierung stabilisierter Mikrotubuli durch Tubulysin

Mit den beschriebenen Versuchen zur *in vitro* Polymerisation in Anwesenheit von mikrotubulistabilisierenden Stoffen war geklärt, daß Tubulysin die Polymerisation von Tubulindimeren hemmt und zur Depolymerisation bereits polymerisierter Mikrotubuli führt. In folgendem Versuch wurde die Wirkung von Tubulysin auf die durch Taxol oder Epothilon stabilisierten Mikrotubuli untersucht. Tubulin ( $10\ \mu\text{M}$ ) wurden mit Taxol oder Epo B (je  $1\ \mu\text{M}$ ) auspolymerisiert. Nach 13 Minuten wurde zu jedem Ansatz  $6\ \mu\text{M}$  Tubulysin zugegeben. Abbildung 3.24 zeigt, daß im Kontrollansatz ohne Zusätze die Reaktion bis Ende der Messung in einen konstanten Gleichgewicht blieb, während die Absorption nach Zugabe von Tubulysin abnahm.



**Abb. 3.24** Wirkung von Tubulysin auf die durch Taxol (□) und Epo B (▲) stabilisierten Mikrotubuli. Die Zugabe von Tubulysin erfolgte 13 min nach Reaktionsstart. Kontrolle (■)

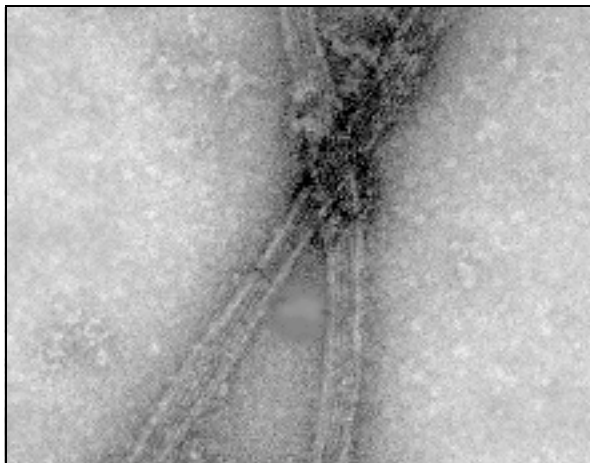
## 4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

### 4.4.1 Entstehung von Ringstrukturen durch Einwirkung des Tubulysins

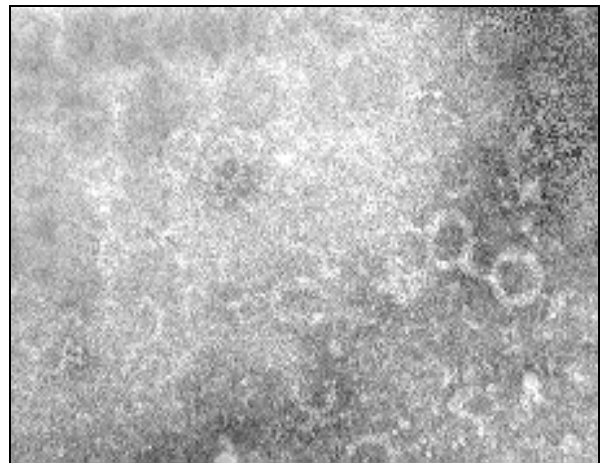
Die Untersuchungen zur Einwirkung von Tubulysin auf das Cytoskelett und auf die Polymerisation von Tubulin *in vitro* haben nun gezeigt, daß das Tubulin/Mikrotubulsystem das primäre Target des Tubulysins ist. Nach Negativkontrastierung konnten die Mikrotubuli im Elektronenmikroskop auf feinere Details hin untersucht werden. Die Versuche wurden dazu in einem auf 30 °C temperierten Raum durchgeführt.

In der Kontrolle, in der das Tubulin bei 37 °C für 20 min ohne Hemmstoff inkubiert wurde, lagen lange einzelne und gebündelte Mikrotubuli vor. Tubulysin wurde nun entweder vor der Polymerisation zur Tubulinlösung gegeben, um den Einfluß auf die Polymerisation zu beobachten, oder zu auspolymerisierten Mikrotubuli, um die Depolymerisationswirkung und die Depolymerisationsprodukte zu zeigen. Die erste Versuchreihe wurde in Anwesenheit der MAPs durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, daß Tubulysin in einer Konzentration von 2 µM die Polymerisation des Tubulins stark hemmt, so daß nur selten kurze Mikrotubulistücke gefunden wurden. Außerdem bildeten sich ringförmige Polymere. Die meisten waren einzelne Einfachringe, einige waren Doppelringe (8-Form; Abbildung 3.25 A und B).

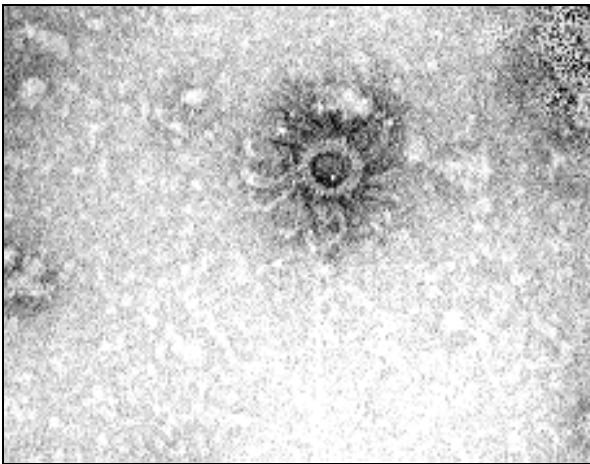
Wenn 2 µM Tubulysin zu auspolymerisierten Mikrotubuli gegeben wurde, war die Wirkung noch dramatischer. Fast alle Mikrotubuli wurden abgebaut. Statt dessen wurden viele Einfachringe mit einem Durchmesser von 37 - 42 nm (Abb. 3.25 B und D) sowie Doppelringe und Schaufelräder (Pinwheels) gebildet. Die letzte Form (Abb. 3.25 E) wurde sowohl als Depolymerisationsprodukt als auch bei einer Polymerisationshemmung gefunden, aber nur in Anwesenheit von MAPs. Die Schaufelradstrukturen hatten einen Gesamtdurchmesser von 90 bis 100 nm und bestanden aus einem Ring (40 -45 nm) und einer nicht bestimmbaren Anzahl von Armen (je 50-55 nm lang). In Abwesenheit der MAPs entstanden meist formlose Aggregate, gekrümmte Bruchstücke und nur vereinzelt Ringe. Allgemein waren dann die Mikrotubuli sowohl in der Kontrolle als auch in Gegenwart von Tubulysin sehr viel kürzer.



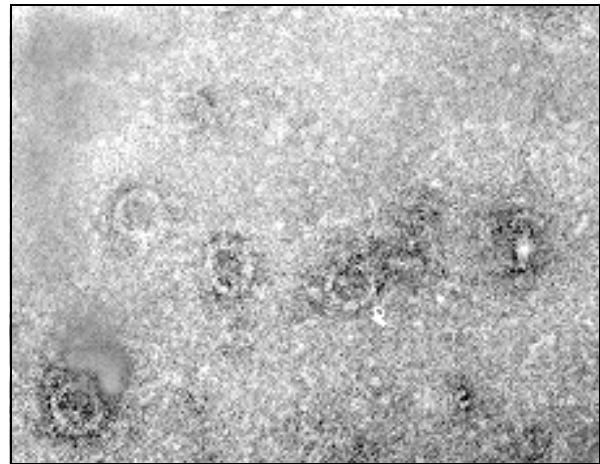
**A)** Vergrößerung 200.000 X



**B)** Vergrößerung 200.000 X



**C)** Vergrößerung 200.000 X



**D)** Vergrößerung 200.000 X

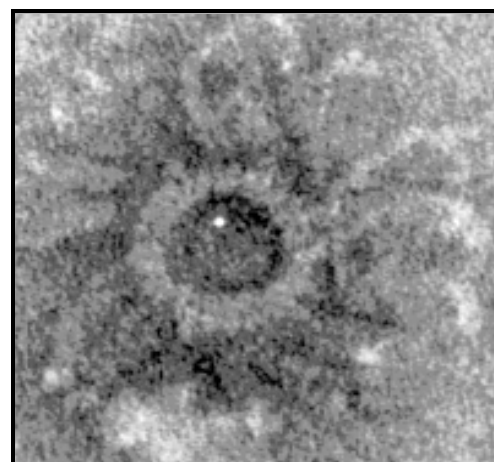
**Abb3.25** Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer negativkontrastierten Mikrotubulilösung zeigen den Einfluß des Tubulysins auf ihre Polymerisation.

**A)** Kontrolle (ohne Tubulysin)

**B)** Die Polymerisation in Gegenwart von 2  $\mu$ M Tubulysin

**C) und D)** Depolymerisation von Mikrotubuli durch 2  $\mu$ M Tubulysin

**E)** Die Struktur eines Schaufelrads



**E)** Vergrößerung 1000.000 X

## **4.5 Untersuchung zur Bindungsstelle des Tubulysins am Tubulin**

### **4.5.1 Konkurrenz von Tubulysin zu Colchicin und Vinblastin**

Es gibt zahlreiche Substanzen, die an Tubulindimere binden. Trotzdem ist bisher nur die Colchicinbindungsstelle genau lokalisiert. Die Vinca-Alkaloide besitzen eine eigene Bindungsstelle, die aber bis jetzt nicht genau bekannt ist (s. auch 1.3). In dem folgenden Versuch wurde die Konkurrenz zwischen Tubulysin und Colchicin bzw. Vinblastin untersucht.

Der Test ist unter 2.9.9 beschrieben.  $^3\text{H}$ -Colchicin oder  $^3\text{H}$ -Vinblastin und Tubulysin konkurrierten dabei in verschiedenen Konzentrationen um die Bindungsstellen am Tubulin.

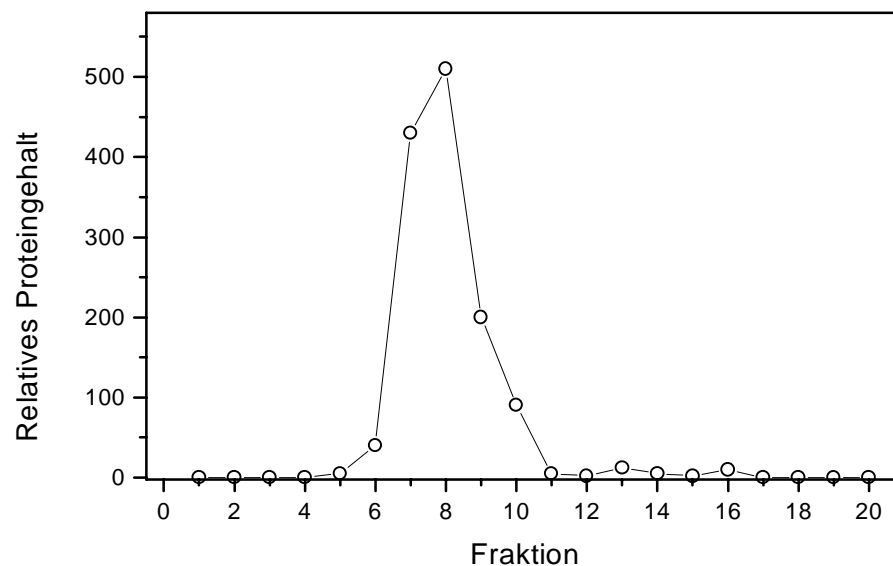
Die Trennung von freier und gebundener Radioaktivität wurde mittels DEAE-Zellulose-Filterpapiere oder durch Gelfiltration-Chromatographie durchgeführt. Das Elutionsprofil wurde verfolgt, wie in Abbildung 3.26 gezeigt. Die Fraktionen wurden gesammelt und für jede Fraktion wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten folgendes. Tubulysin verdrängte das radioaktiv markierte Colchicin nur schwach aus seinen Bindungsstellen am Tubulin (Abbildung 3. 27) Gemessen wurde die am Tubulin verbliebene  $\beta$ -Strahlung, die gebundenem  $^3\text{H}$ -Colchicin bzw.  $^3\text{H}$ -Vinblastin entspricht. Die Werte wurden als % der Kontrolle angegeben. Tubulysin hemmte die Bindung von Colchicin bis maximal 35 % bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  Tubulysin. Eine Erhöhung der Tubulysinkonzentration darüber hinaus hatte keinen Einfluß mehr auf die verbliebene gebundene Colchicin-Menge. Interessanterweise waren die Bindungskurven mit 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Colchicin gleich.

Im Fall des Vinblastins war zu erkennen, daß Tubulysin die Vinblastin-Radioaktivität sehr stark verdrängte. Eine Tubulysinkonzentration von 0,8  $\mu\text{M}$  reduzierte die gebundene Radioaktivität des Vinblastins (5  $\mu\text{M}$ ) auf ca. 50%, und bei einer Tubulysinkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  verblieben nur 10 % der Vinblastin-Radioaktivität am Tubulin. Mit 10  $\mu\text{M}$  Vinblastin benötigte man, wie in Abbildung 3.27 zu sehen ist, ca. 1,4  $\mu\text{M}$  Tubulysin, um die Bindung von Vinblastin an Tubulin um 50 % zu reduzieren. In einem weiteren Versuch wurde Tubulin (0,7 mg/ml) mit 1,5  $\mu\text{M}$  Tubulysin (die Konzentration, die 10  $\mu\text{M}$  Vinblastin zu ca. 50 % verdrängt) vermischt und dann mit steigenden  $^3\text{H}$ -Vinblastinmengen versetzt und inkubiert. Wie Abbildung 3.28 zeigt, nahm die gebundene Vinblastin-Radioaktivität der Kontrolle ohne Tubulysin mit wachsender

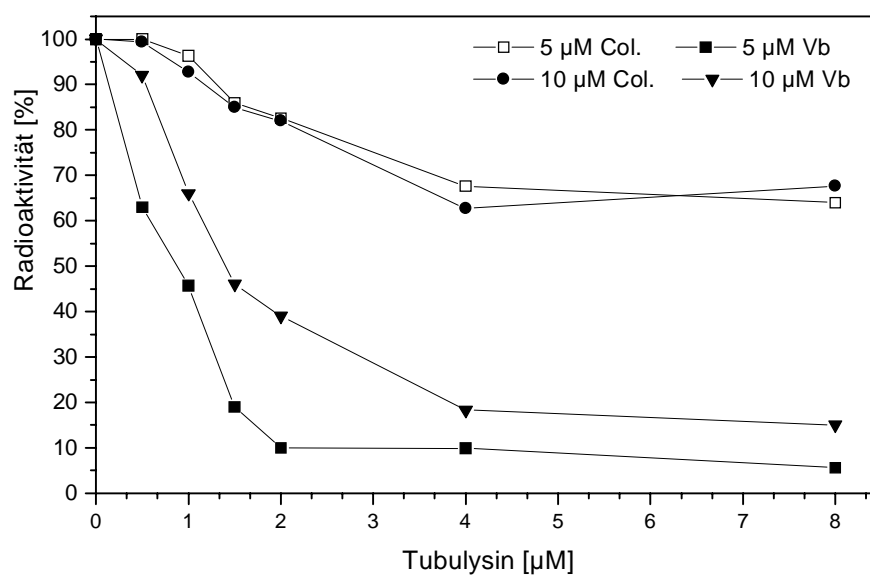


$^3\text{H}$ -Vinblastinkonzentration zu. In Anwesenheit von Tubulysin wurde die Bindung des Vinblastins vollständig gehemmt. Die gebundene Radioaktivität blieb minimal und konzentrationsunabhängig konstant.

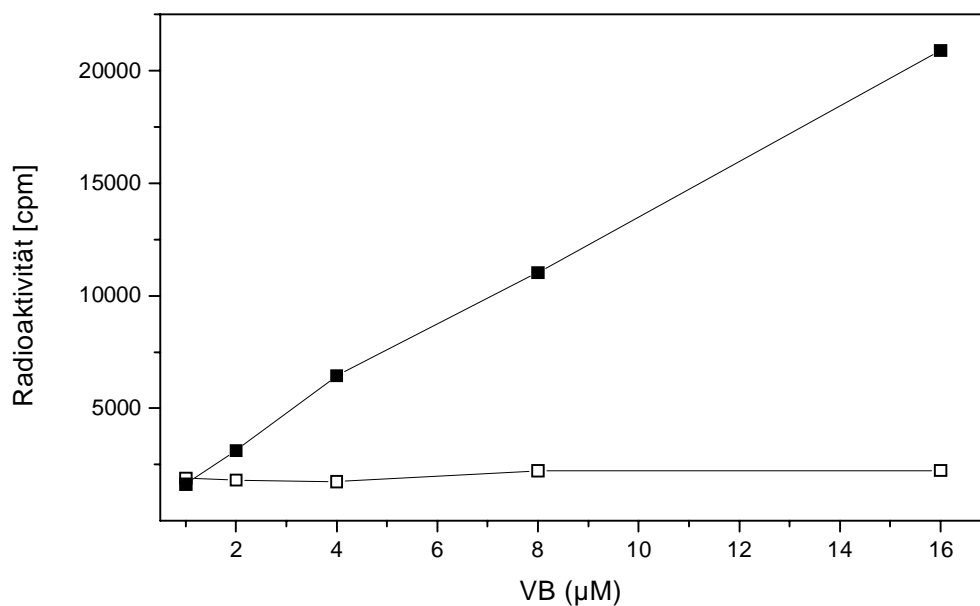
Zusammenfassend ist festzustellen, daß Tubulysin in der Lage ist, Vinblastin und teilweise auch Colchicin aus ihrer Bindung an Tubulin zu verdrängen. Daraus kann man ableiten, daß das Tubulysin über die Vinblastin- und teilweise auch über die Colchicinbindungsstelle mit dem Tubulinprotein wechselwirkt. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die Konkurrenz zwischen Tubulysin und den beiden Wirkstoffen nicht kompetitiv ist. Die Bindung von Colchicin und Vinblastin könnte auch durch Veränderung der Konformation des Tubulinmoleküls durch Tubulysin gehemmt werden. Eine Interaktion mit den MAPs ist sehr unwahrscheinlich, da ähnliche Ergebnis auch bei Ansätzen mit MAPs-freiem Tubulin erzielt wurden.



**Abb. 3.26** Das Elutionsprofil der Proteinfractionen von einer PD-10-Säule mit Sephadex-G 25. Nach Trennung wurden die Fraktionen 7, 8 und 9 vereinigt.



**Abb. 3.27 Konkurrenz zwischen Tubulysin und Vinblastin bzw. Colchicin um die Bindung am Tubulin. Colchicin 5 (□) und 10 (●) µM. Vinblastin 5(■) und 10 µM(▼).**

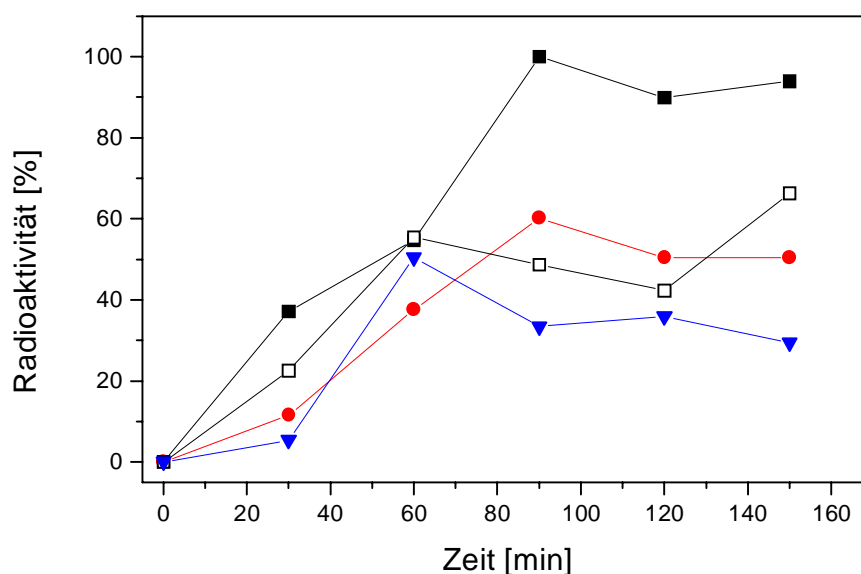


**Abb. 3.28 Bindung steigender Vinblastinmengen (VB) an Tubulin (0,56 mM) ohne (■) und mit 1,5 µM Tubulysin (□).**

## **4.6 Interaktion zwischen Tubulin und Tubulysin**

### **4.6.1 Die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulinalkylierung mit Iod[<sup>14</sup>C]acetamid**

In diesem Versuch wurde der Einfluß von Tubulysin sowie zweier Vergleichssubstanzen auf eine zeitabhängige Tubulinalkylierung durch Iod[<sup>14</sup>C]acetamid untersucht. Ziel dieses Versuchs war, den Bindungsort von Tubulysin am Tubulin zu lokalisieren. Tubulin wird durch die Inkubation mit Iodacetamid bei 37 °C alkyliert. Die Alkylierung ist zeit- und temperaturabhängig. Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurde Tubulin ohne oder mit den Wirkstoffen für 60 min inkubiert. Danach erfolgte die Iod[<sup>14</sup>C]acetamid-Alkylierung. Der nicht gebundene Anteil des Iod[<sup>14</sup>C]acetamids und der Testsubstanzen wurde durch Gelfiltration oder DEAE-Zellulose-Filtration entfernt. Je länger die Inkubation mit Iodacetamid dauerte, desto mehr Tubulin-Thiol-Gruppen wurden alkyliert und umso höher war die gemessene Radioaktivität. In Abbildung 3. 29 sind die gemessenen Werte in % der Kontrolle dargestellt. Die Kurven zeigen, daß Tubulysin wie Vinblastin und Phomopsin A die Tubulinalkylierung inhibierten. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Bindung von Tubulysin bzw. Phomopsin A und Vinblastin an Tubulin die Alkylierung von Tubulin vermindert.



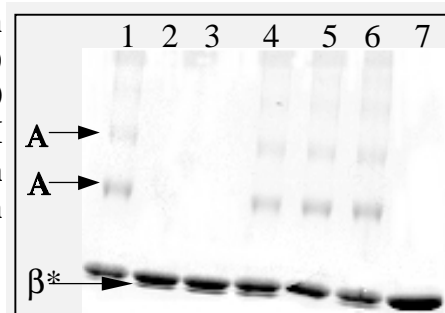
**Abb.3.29** Die Alkylierung von Tubulin durch Iod[<sup>14</sup>C]acetamid ohne (■) und mit 10 μM Vinblastin (□), 10 μM Phomopsin A (▼) oder 10 μM Tubulysin (●)

#### 4.6.2 Die Einwirkung der Tubulysine auf die Tubulin -Alkylierung durch *N,N'*-Ethylenebis(iodacetamid) (EBI)

Das bifunktionelle Analog des Iodacetamids, EBI gleich *N,N'*-Ethylenbis(iodacetamid), wurde in diesem Versuch als Marker für die Tubulinsulfhydrylgruppen eingesetzt. EBI reagiert mit dem Tubulinmolekül und führt zur Bildung von zwei Cystein-Cystein-Quervernetzungen (intra-chain crosslinks) im  $\beta$ -Tubulin zwischen Cys<sup>239</sup> und Cys<sup>354</sup> und zwischen Cys<sup>12</sup> und Cys<sup>201</sup> bzw. Cys<sup>211</sup> (Little, 1985). Das Tubulin wird dann als  $\beta^*$  bzw.  $\beta^s$  bezeichnet. Das  $\beta^*$ -Tubulin wandert in der SDS-PAGE bei 56 kDa und damit schneller als die  $\beta^s$  Form, die bei 60 kDa wandert. Das Verhältnis von  $\beta^s$  zu  $\beta^*$  wird von einigen Antimikrotubulstoffen beeinflusst. Colchicin und Podophyllotoxin inhibieren die Bildung von  $\beta^*$ , während sie von Vinblastin und Phomopsin gefördert wird. Im Idealfall sollten auf dem Gel drei Flecken ( $\alpha$ ,  $\beta^s$ ,  $\beta^*$ ) detektiert werden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten  $\alpha$  und  $\beta^s$  jedoch nicht voneinander getrennt werden. Außerdem bewirkt EBI die Bildung von Tubulinaggregaten, die ein hohes Molekulargewicht haben und kaum durch das Gel wandern (Ludueno und Roach, 1981). In Abbildung 3. 30 kann

man die  $\beta^*$ -Form als kleine Schulter in der Kontrolle (Spur 1) sehen. In den Versuchen mit 20  $\mu\text{M}$  Tubulysin (Spur 2), Phomopsin A (Spur 3) oder Vinblastin (Spur 4) tritt diese  $\beta^*$ -Schulter noch deutlicher hervor. Diese  $\beta^*$ -Tubulin Schulter wurde aber nicht in Gegenwart von 40  $\mu\text{M}$  Colchicin (Spur 5) und bei unbehandeltem Tubulin (Spur 7) beobachtet. Sie war auch schwach in Gegenwart von 1 mM GTP (Spur 6) zu sehen. Außerdem sind zusätzliche Banden (Pfeile) durch Tubulinaggregation in den Spuren 1, 4, 5 und 6 zu erkennen. Diese Aggregate sind aber nicht in den Spuren 2 (Probe mit 20  $\mu\text{M}$  Tubulysin), 3 (Probe mit 20  $\mu\text{M}$  Phomopsin A) und 7 (nicht mit EBI behandelt) zu sehen. Zusammenfassend kann man sagen, daß Tubulysin die Bildung von  $\beta^*$ -Tubulin fördert.

**Abb. 3.30** SDS-PAGE von Tubulin nach Alkylierung durch EBI: ohne (1) oder mit 20  $\mu\text{M}$  Tubulysin (2); 20  $\mu\text{M}$  Phomopsin A (3); 20  $\mu\text{M}$  Vinblastin (4); 40  $\mu\text{M}$  Colchicin (5); 20  $\mu\text{M}$  GTP (6) und Tubulin ohne EBI (7).  $\beta^*$ :  $\beta^*$ -Tubulin, A: Aggregate.

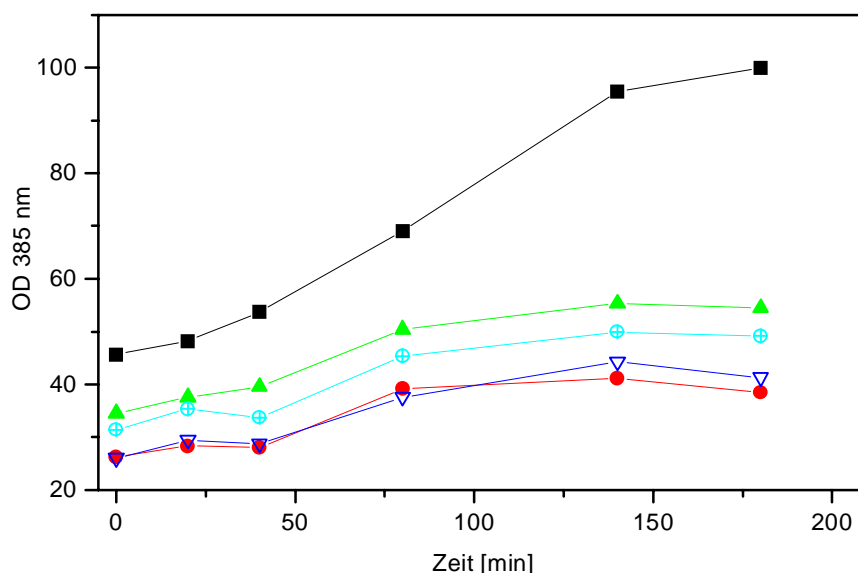


#### 4.6.3 Die Einwirkung von Tubulysin auf den Tubulin-Zerfall (Decay)

Während einer Inkubation bei höheren Temperaturen treten zeit- und temperaturabhängig strukturelle Änderungen im Tubulinmolekül auf. Die Zahl der hydrophoben Bindungsstellen nimmt zu, und das Tubulin verliert die Fähigkeit zu polymerisieren. Ein unter 2.9.11 beschriebener Test ermittelte die Einwirkung von Tubulysin, Epothilon, Vinblastin und Phomopsin A auf diesen Prozeß. Der Fluoreszenzmarker Bis(1,8-anilinnaphthalensulfonat) (Bis-ANS) bindet an hydrophoben Stellen im Proteinmolekül (Brand, 1972). Diese Reaktion kann fluorometrisch verfolgt werden.

In 30-minütigem Abstand wurde die Fluorezenzintensität bei 490 nm (Anregung 385 nm)

gemessen und im Vergleich zur Kontrolle graphisch dargestellt. Wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, hemmen Vinblastin (40  $\mu\text{M}$ ) und Phomopsin (40  $\mu\text{M}$ ) den Zerfall des Tubulins. Die hier gefundenen Raten sind mit denen in der Literatur vergleichbar. Erwartungsgemäß konnte auch das Tubulysin in einer niedrigeren Konzentration (20  $\mu\text{M}$ ) den Zerfall des Tubulins hemmen. Überraschenderweise wirkt auch Epothilon (10  $\mu\text{M}$ ), das im Gegensatz zu den anderen drei Stoffen die Polymerisation von Tubulin fördert (s. auch Einleitung), dem Zerfall entgegen.



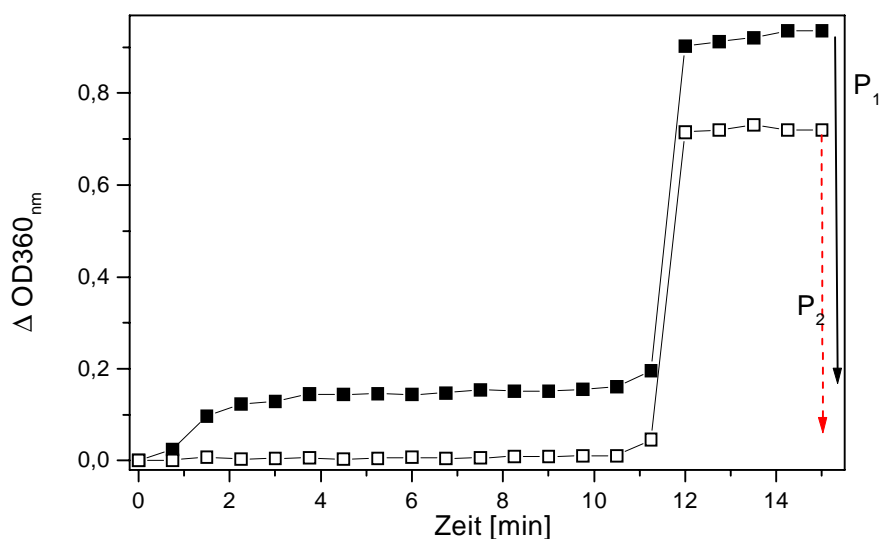
**Abb. 3.31** Bestimmung des Tubulin- Zerfalls durch Tubulin-Bis-ANS-Bindungsassay. Die Kurven zeigen die Wirkung von Tubulysin 20 (●), Vinblastin 40 (▲), Phomopsin A 40 (▽) und Epothilon 10  $\mu\text{M}$ (⊗) gegenüber einer Kontrolle (■) auf den Tubulin-Zerfall.

#### 4.7 Die Einwirkung von Tubulysin auf die GTPase-Aktivität des Mikrotubuli-Systems

Das Tubulinheterodimer bindet zwei Moleküle GTP, ein austauschbares an  $\alpha$ -Tubulin und ein nichtaustauschbares an  $\beta$ -Tubulin. Bei der Tubulinpolymerisation hydrolysiert das erste zu GDP

und Phosphat ( $P_i$ ). In diesem Versuch sollte das freigesetzte Phosphat durch einen enzymatischen Test bestimmt (s. unter 2.9.12) und dadurch die GTPase-Aktivität des Tubulins photometrisch verfolgt werden. Da das Absorptionsmaximum des im Test freigesetzten Aminomercaptomethylpurins bei 360 nm liegt, konnten die Tubulinpolmerisation, die bei 350 nm gemessen wird, und die Phosphatfreisetzung nicht parallel gemessen werden.

Deshalb wurde das Tubulin ohne oder mit Tubulysin zunächst bei 37 °C auspolymerisiert und danach zu jedem Ansatz eine Mischung von MESG + PNP-Enzym zugegeben. Nach dieser Zugabe stieg die Extinktion schnell an (Abb. 3.29). Die Extinktionzunahme entspricht dem durch GTP-Hydrolyse freigesetzten Phosphat. Sie betrug für die Kontrolle 0,765 und für die Probe mit 2  $\mu$ M Tubulysin 0,698. Das heißt, daß in Gegenwart von Tubulysin die GTPase Aktivität des Tubulins nur leicht gehemmt war. In Gegenwart von Tubulysin sind die Werte des freigesetzten Phosphats ziemlich hoch, trotz der Hemmwirkung des Tubulysin. Es ist möglich, daß das GTP auch in Gegenwart von Tubulysin für die Bildung von Ringstrukturen verbraucht wurde.



**Abb.3.32** Die Wirkung von Tubulysin auf die GTPase Aktivität des Tubulins. Die Enzym-Substrat-Mischung wurde 11 min nach Polymerisationsbeginn des Tubulins ohne (■) oder mit 2  $\mu$ M Tubulysin(□) bei 37 °C zugegeben.

## **5                    Diskussion**

### **5.1                Allgemeines zur Wirkung von Tubulysin**

Mikrotubuli spielen eine große Rolle als formgebende Strukturen des Cytoskeletts, als wesentliche Bestandteil des Spindelapparat während der Mitose und als Schienen für den intrazellulären Transport. Alle Mikrotubuli sind aus  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren aufgebaut. Eine Reihe von Verbindungen, die auf die Zellmikrotubuli wirken, verursachen charakteristische Veränderungen der Zellmorphologie. Bei Betrachtung der Substanzklassen, für die eine gegen die Mikrotubuli gerichtete Aktivität nachgewiesen wurde, fällt sofort die strukturelle Vielfalt ins Auge. Unter ihnen befinden sich eine Reihe von Naturstoffklassen wie Vinca-Alkaloide, Taxoide, eine Gruppe um die bekannten Vertreter Colchicin und Podophyllotoxin, eine Reihe verschiedener Heterozyklen, wie Benzimidazolcarbamate, den Steroiden zugehörige Wirkstoffe und andere Strukturen. Praktisch alle Wirkstoffe, die sowohl die Struktur als auch die Organisation der Mikrotubuli angreifen, treten mit deren Hauptbestandteil, dem  $\alpha/\beta$ -Heterodimer in Wechselwirkung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Wirkungsmechanismus des aus Myxobakterien isolierten Tubulysins untersucht. Die Untersuchungen an tierischen Zellkulturen zeigten, daß Tubulysin cytopathogen wirkt und ein sehr starkes cytotoxisches Potential hat. Es führte zu lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen der tierischen Zelle. Die behandelten Zellen nahmen nach Zugabe von Tubulysin innerhalb weniger Stunden im Vergleich zur Kontrolle eine abgerundete Gestalt an und hafteten weniger gut aneinander wie auch an der Wandung des Kulturgefäßes. Eine längere Inkubation der Zellen mit Tubulysin führte zu einer Größenzunahme der Zellen und der Zellkerne, die schließlich in unregelmäßige Vesikel zerfielen. Die Zellen waren nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Die Kontrollmechanismen der Zellteilung bzw. der Spindelapparat sind vermutlich durch die Zerstörung der Cytoskelettmikrotubuli außer Funktion gesetzt worden.



## 5.2 Tubulysin und Mikrotubulicytoskelett

Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten, daß Tubulysin die Mikrotubuli schnell und in geringer Konzentration angreift, so daß man nach Inkubation der PtK<sub>2</sub>-Zellen mit 20 nM schon nach wenigen Stunden die ersten Veränderung im Mikrotubulinetz sah. Nach einem Tag war das gesamte Mikrotubulisystem bis auf die MTOCs vollständig abgebaut. Die MTOCs verschwanden später ebenfalls. Möglicherweise greift das Tubulysin auch das  $\gamma$ -Tubulin, den Tubulinbestandteil der Centrosomen, an. Die Einwirkung von Tubulysin auf die Zellmikrotubuli von PtK<sub>2</sub>-Zellen konnte auch elektronenmikroskopisch festgestellt werden. Bei den behandelten Zellen wurden sehr wenige Mikrotubuli im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten auch eine Wirkung auf die Zellkerne, die sich zunächst vergrößerten und dann in Zellkernfragmente zerfielen. Diese Wirkung war der erste Hinweis auf eine Apoptose (3.2).

Tubulysin blockiert wie Colchicin die Bildung von Spindel-Mikrotubuli. Jedoch wird im Gegensatz zu Tubulysin die Depolymerisation der Mikrotubuli durch Colchicin nicht beeinflusst. Die durch Colchicin gehemmte Tubulinanlagerung stört das dynamische Gleichgewicht von Polymerisation und Depolymerisation und führt dadurch zu einem Verlust an Mikrotubuli unter Akkumulation von freiem Tubulin. Entfernt man durch mehrmaliges Waschen das Colchicin aus dem Kulturmedium, erholen sich die Zellen und die Mikrotubuli bilden sich zurück (Darnell et al., 1994). Im Gegensatz dazu konnten sich die Zellen nach dem Entfernen von Tubulysin aus dem Kulturmedium durch mehrmaliges Waschen nicht erholen; d. h. die Wirkung von Tubulysin konnte nicht aufgehoben werden. Dies liegt wahrscheinlich an der schnellen, irreversiblen Einwirkung von Tubulysin. In Versuchen, bei denen die Zellen mit nur 10 nM Tubulysin behandelt wurden, wurden teilweise die Mikrotubuli zurückgebildet. Höchstwahrscheinlich greift das Tubulysin die Mikrotubuli nicht mit dem gleichen Mechanismus wie Colchicin an.

Nachdem sich die antimikrotubuläre Wirkung des Tubulysin *in vivo* erwiesen hatte, wurde eine Prüfung auf additive oder synergistische Effekt mit Colchicin, Vinblastin, Taxol und Epothilon durchgeführt. Das Vinca-Alkaloid Vinblastin bindet an den Enden der Mikrotubuli und verhindert somit die weitere Anlagerung von Dimeren. Außerdem führt es zur Bildung von losen

spiralförmigen Mikrotubuli im Cytoplasma sowie parakristallinen Strukturen. Die Kombination von Vinblastin und Tubulysin oder Colchicin und Tubulysin resultierte *in vivo* weder in einem additiven noch in einem synergistischen Effekt. Die Wirkung von Tubulysin war aber im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen viel stärker und schneller.

Die Taxoide Taxol und Taxotere sind antimitotische Agenzien, die im Gegensatz zu den bereits genannten Verbindungen die Zellmikrotubuli stabilisieren (Rowinsky, *et al.*, 1992). Diese Verbindungen werden in der Krebstherapie eingesetzt, da wegen der Hemmung der Spindelbildung die sich schnell teilenden Tumorzellen absterben (Wani *et al.*, 1971; Schiff, 1979; Rowinsky, 1991).

Die Wirkungsweise von Epothilon und Taxol sind ähnlich (s. Einleitung). Sie binden an die Enden der Mikrotubuli, stabilisieren diese stark und führen zur Bildung von Mikrotubuli-Bündeln (Derry *et al.*, 1995; Kowalski *et al.*, 1997). Eine kombinierte Zugabe von Taxol oder Epothilon B und Tubulysin zeigte, daß die Wirkung von Tubulysin durch die beiden Substanzen nicht beeinflußt wird.

### 5.3 Die antimitotische Wirkung des Tubulysins

Der Vorgang der Zellteilung von Eukaryoten besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Ereignissen: der Teilung des Zellkerns (der Mitose) und der Teilung des Cytoplasmas (der Cytokinese). Alle vier Strukturkomponenten des Zellkerns (Chromatin, Nukleoli, Kerngrundsubstanz und Kernhülle) verändern sich, wenn dieser sich zur Kernteilung anschickt. Zellen durchlaufen während ihrer Teilung schrittweise einen Zellzyklus. Der normale Zellzyklus eukaryotischer Zellen beginnt aus der  $G_0$ -Phase heraus und verläuft über vier Stadien, die als  $G_1$ -, S-,  $G_2$ - und M-Phase bezeichnet werden.  $G_1$  und  $G_2$  (G von engl. gap, d.h. Lücke) sind Ruhephasen vor und nach der DNA-Synthese, die in der S-Phase stattfindet. Während der M-Phase findet die Zellteilung statt. In der Zeit zwischen den Zellteilungen (Interphase) werden die meisten Zellbestandteile ununterbrochen produziert. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, daß die Zellen nach der Zugabe von Tubulysin in der  $G_2$ -Phase akkumulierten, während sich die Mehrheit der Zellen der Kontrolle in der  $G_0/G_1$ -Phase befand. Der Anteil der Zellen in der S-Phase hatte sich auch nach 48 Stündiger Inkubation mit Tubulysin nicht verändert, d.h. die Synthese der DNA war über 48 Stunden nicht gestört (3.3). Offensichtlich ist die Mitose

blockiert, bei der die Mikrotubuli eine zentrale Funktion haben. Sie sind verantwortlich für die Bildung der Mitosespindel und damit unabdingbar für die Segregation der Tochterchromosomen. Alle Antitubulin-Wirkstoffe blockieren ohne Ausnahme die Mitose. Tubulysin blockiert die Polymerisation des Tubulins und damit die Bildung von Mikrotubuli bzw. einer Mitosespindel. Es könnte auch sein, daß Tubulysin wie andere antimitotische Stoffe die Struktur der Mikrotubuli verändert und damit den Aufbau des Spindelapparates stört (Hamel, 1996).

## **5.4 Apoptose-Induktion durch das Tubulysin**

Der Begriff Apoptose (aktiver Zelltod oder Zell-Selbstmord) wird benutzt, um einen besonderen Modus des Zelltods zu bezeichnen, der sich in bestimmten Veränderungen im Zellkern und im Zytoplasma zeigt. Der Begriff Apoptose beschrieb ursprünglich in erster Linie die Morphologie von sterbenden Zellen.

Apoptose unterscheidet sich von dem sonst üblichen Mechanismus des Zelltods, der Nekrose (Schrumpfung). In Geweben erzeugt Apoptose kaum Entzündungen, weil die Zellreste (apoptotische Körper) von den Nachbarzellen, vor allem von Makrophagen phagocytiert und daher nicht freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu wird bei einer Nekrose das Zelllysat freigesetzt, was eine Reizwirkung auf die nahegelegenen Zellen hat und so eine Entzündung verursacht.

Das Interesse an Apoptose in der Krebsforschung ist in den letzten Jahren angestiegen, da eine Apoptose durch eine Vielzahl von Antitumorstoffen, Strahlung oder Hyperthermie hervorgerufen werden kann.

Im allgemeinen wird angenommen, daß der apoptotische Zelltod durch Fehlen eines Wachstumsfaktors oder durch Verabreichung eines Xenobiotikums, wie eines krebstherapeutischen Stoffs, hervorgerufen wird. Die morphologischen Veränderungen sind immer noch die wichtigsten Kriterien bei der Diagnose der Apoptose im Gewebe. Dabei ist eine Schrumpfung der Zellen und eine Kondensation der Zellkerne deutlich zu erkennen. In reinen Zellpopulation dienen biochemische Änderungen an der Chromatinstruktur und die spezifische Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen zum Nachweis der Apoptose (3.4.3). Die Spaltung der chromosomalen DNA in den früheren Stadien der Apoptose erzeugt Bruchstücke in der Größenordnung von 50 bis 300 kB (Oberhammer et al., 1993; Walker et al., 1994). Es

wurde auch festgestellt, daß in der frühen Phase der Apoptose die DNA in den Mitochondrien intakt blieb. Darauf baut auch eine neue Methode zur Bestimmung und Quantifizierung der Apoptose auf (Tepper 1993; Walker et al., 1994). Ein Abbau der DNA allein ist kein Nachweis für eine Apoptose, sondern beweist nur allgemein den Zelltod. Die klassische biochemische Methode zur Detektierung von Apoptose ist das Auftrennen oligonucleosomaler DNA-Bruchstücke durch Agarose-Gelelektrophorese, wobei Banden im definierten Abständen, die sogenannte Apoptoseleiter, entstehen (Kerr *et al.*, 1972; Skalka *et al.*, 1976).

Die Demonstration einer erhöhten nukleären Proteaseaktivität kann diesen Beweis stützen (Kaufmann *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu sind eine erhöhte Membrandurchlässigkeit, die einen Farbstoffeintritt erlaubt (z.B. Trypanblau), das Auftreten von DNA-Strangbrüchen, eine Thymidinfreisetzung und weitere Verfahren für den Apoptose-Nachweis unbrauchbar.

Es wird vermutet, daß im Verlauf der Apoptose eine Gen-Kaskade exprimiert wird. In *Caenorhabditis elegans* beispielsweise wurden mehrere Gene identifiziert, deren Expression die verschiedenen Schritte der Apoptose bewirken (Ellis, 1986). Ein wichtiges Gen für die Initiation des Apoptose-Programms ist *ced-3*; ein ähnliches Gen codiert bei Säugetieren das Interleukin-1 $\beta$ -Converting-Enzym (ICE; Miura et al., 1993). Weitere wichtige Gene für die Apoptose sind in Prostatazellen von Säugetieren (*TRPM-2*, Testosterone-repressed prostatic message-2; Wong *et al.*, 1993), in T-Lymphozyten (*fas/APO*-Gen; Itoh *et al.*, 1991; Oehm *et al.*, 1992), und in vielen anderen Zellen (*p53*, *c-fos*,  *$\beta$ -1*-Gen, transformierter Wachstumsfaktor, *c-myc*, *ras*, Ornithin-Decarboxylase- und Calmodulin-Gen; Eastman *et al.*, 1994) identifiziert worden.

In der vorliegenden Arbeit (3.4.1) wurde gezeigt, daß nach 6 Stunden Inkubation mit Tubulysin oder Camptothecin (Abb. 3.9 A und 3.9 B) konzentrationsabhängig die cytoplasmatischen Mono- und Oligonukleosomen deutlich zunahmen. Ein weiterer Beweis für eine Apoptoseinduktion durch Tubulysin war die konzentrationsabhängige Zunahme von DNA-Fragmenten im Cytoplasma bei U-937 Zellen nach Behandlung mit Tubulysin A oder Tubulysin D. Die Induktion einer Apoptose durch Tubulysin muß in einer zukünftigen Arbeit weiter untersucht werden.

Da Tubulysin *in vivo* antimittotische Aktivitäten zeigt und eine Apoptose induziert, erfüllt es die Voraussetzungen für eine weitere Prüfung als Antitumor-Substanz. Bei der Übertragung von

Ergebnissen mit Zellkulturen auf den Gesamtorganismus müssen natürlich auch Faktoren wie Pharmakokinetik, Metabolismus und Verträglichkeit studiert werden. Für die verschiedenen untersuchten Zelllinien weist Tubulysin eine sehr hohe Toxizität auf. Durch chemische Modifikationen könnte versucht werden, das therapeutische Potential zu verbessern, um erfolgsversprechendere Derivate für die Agrarwirtschaft, Tier- oder Humanmedizin zu entwickeln. Eine weitere Möglichkeit wäre die Suche nach neuen natürlichen Derivaten.

## 5.5 Die Tubulinpolymerisation *in vitro*

In dieser Arbeit wurde das Tubulinprotein aus Schweinehirn über aufeinanderfolgende Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation isoliert. Das Verfahren beruht auf den besonderen Eigenschaften des Tubulins. Gelöstes Tubulin polymerisiert *in vitro* in Gegenwart von GTP bei 37 °C unter Bildung von Mikrotubuli, sofern die Lösung kein  $\text{Ca}^{+2}$  enthält. Wenn man die Mikrotubuli abkühlt, depolymerisieren sie unter Rückbildung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulineinheiten.

Da das Zusammenspiel der Faktoren, welche die Polymerisation der Mikrotubuli beeinflussen, ziemlich komplex ist, konnte die genaue Abhängigkeit der Tubulinpolymerisation von jedem einzelnen Faktoren in dieser Arbeit nicht behandelt werden. Zumindest aber wurde versucht, eine vergleichende Studie mit einigen der bekannten Faktoren, wie GTP, der Zeit des temperaturabhängigen Tubulin Zerfalls, der Tubulinaalkylierung und dem Einfluß von Substanzen, wie Colchicin, Vinblastin und Phomopsin A durchzuführen. Das Ziel dieses Vergleichs war, eine Vorstellung über den Wirkungsmechanismus des Tubulysins zu gewinnen. Hier handelte es sich um die Einwirkung von Tubulysin auf die Tubulinpolymerisation im Vergleich zu bekannten Wirkstoffen, die schon lange in der Chemotherapie eingesetzt werden.

## 5.6 Hemmung der Tubulinpolymerisation

Die Untersuchungen mit isoliertem Tubulin waren unter den gewählten Versuchsbedingungen gut reproduzierbar und entsprechen den Literaturwerten. Die Tubulinproben mußten sowohl mit Tubulysin als auch mit den Vergleichsubstanzen ca. 5 min vorinkubiert werden, um eine maximale Bindung an Tubulin zu ermöglichen (4.3.3). Die Bindung von Tubulysin an die Tubulindimere verschiebt anscheinend das Gleichgewicht zwischen Polymerisation und

Depolymerisation zu Gunsten der Depolymerisation. Es hat sich gezeigt, daß Tubulysin im Vergleich zu den Referenzsubstanzen einer der stärksten Polymerisationshemmer ist (4.3.6). Der  $IC_{50}$ -Wert des Tubulysins betrug  $0,75 \mu M$  für eine Tubulinkonzentration von  $1,25 \text{ mg/ml}$  ( $10 \mu M$ ). Die in der Literatur angegebenen  $IC_{50}$ -Werte betragen für Dolastatin-10  $1,2 \mu M$ , für Phomopsin A  $1,4 \mu M$ , für Vinblastin  $1,5 \mu M$ , für Maytansin  $3,5 \mu M$  und für Rhizoxin  $6,8 \mu M$  (Bai et. al., 1990). Eine vollständige Hemmung der Polymerisation von  $10 \mu M$  Tubulin wurde mit 2 bis  $2,5 \mu M$  Tubulysin A erreicht (mit Dolastatin-10 bei  $2 \mu M$  und mit Vinblastin bei  $3 \mu M$ ; Bai et. al., 1990).

Die stabilisierende Wirkung von Taxol setzt sich gegenüber den destabilisierenden Effekten von Colchicin und Vinblastin durch (Howard und Timasheff, 1988). Bei Tubulysin ist dies anders. Tubulysin hemmt die Tubulinpolymerisation auch in Anwesenheit von Taxol oder Epothilon. Mit Taxol oder Epothilon stabilisierte Mikrotubuli wurden nach Zugabe von Tubulysin ebenfalls depolymerisiert (s. 4.3.9).

Das Tubulysin bewirkt auch *in vitro* eine Depolymerisation der Mikrotubuli (4.3.6). Nach einer Zugabe von  $3 \mu M$  Tubulysin zu *in vitro* gebildeten Mikrotubuli ging die Extinktion aber nur um ca 40 % zurück.

Elektronmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß Tubulysin sowohl die Tubulinpolymerisation blockiert als auch eine Depolymerisierung der Mikrotubuli fördert (4.4.1). Statt Resten von Mikrotubuli wurden aber polymere Strukturen in Form von Ringen und schaufelradartigen Gebilden gefunden. Daraus kann man schließen, daß Tubulysin nicht einfach den Abbau der Mikrotubuli in ihre Bausteine, die Tubulindimere bewirkt, sondern die Bildung oligomerer Ringstrukturen induziert. Diese wurden im Photometer ebenfalls gemessen und bewirkten, daß die Extinktion im Depolymerisationstest mit Mikrotubuli nur auf 60 % des Ausgangswertes zurückging (Abbildung 3.19, s. 4.3.6).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Tubulysin sowohl an die Tubulindimeren bindet und so die weitere Tubulinanlagerung blockiert als auch an Polymere bzw. Oligomere und so die Mikrotubulistruktur stört. Durch diese Bindung kann der Gleichgewichtszustand verschoben werden.

## 5.7 Die Bildung von Ringstrukturen

Es wurde bereits erwähnt, daß Tubulin unter bestimmten Bedingungen, z.B. in Gegenwart von GDP,  $\text{Ca}^{2+}$  und in der Kälte, Ringe ausbildet (s. Einleitung). Diese Ringe liegen meist als konzentrische Doppelringe vor. Sie bestehen aus gekrümmten Protofilamentstücken (Mandelkov et al., 1983) und haben einen mittleren Durchmesser von 30-45 nm (Scheele und Borisy, 1979).

**Dolastatin** hemmt die Polymerisation von Tubulin und konkurriert mit Vinblastin und Phomopsin A um die Vinca-Alkaloid-Bindungsstelle (Vinc-Domäne). Hohe, d.h. superstöchiometrische Konzentrationen von Dolastatin und Vinblastin induzieren in Anwesenheit von MAPs und GTP die Bildung von Tubulinaggregaten in Form von Ringen, Spiralen, zusätzlich induziert Dolastatin "Pinwheels" (Schaufelrädern; Singer et al., 1992). Es gibt jedoch morphologische und strukturelle Unterschiede zwischen den Vinblastin- und Dolastatin-Aggregaten. Deshalb wurde vermutet, daß die Aggregation in den beiden Fällen durch unterschiedliche Mechanismen verursacht wird. Tubulinspiralstrukturen wurden sowohl von Dolastatin als auch von Vinblastin induziert. Sie erscheinen in Anwesenheit von Dolastatin dichter spiralisiert als in Gegenwart von Vinblastin. Bei Anwesenheit von MAPs führt Dolastatin zur Ausbildung von Ringen, Vinblastin dagegen eher zu einem vermehrten Auftreten von Spiralen. Die mit substöchiometrischen Tubulysinkonzentrationen in Anwesenheit von MAPs gefundenen Schaufelradformen wurden bei superstöchiometrischer Konzentration von Dolastatin, aber nicht mit Vinblastin gefunden (Bai et al., 1995).

Der Wirkungsmechanismus von **Phomopsin A** ist ähnlich dem des Dolastatins. Die Verbindung ist aber weniger toxisch. Phomopsin induziert in superstöchiometrischer Konzentration und in Anwesenheit von MAPs Schaufelradformen (Tonsing, 1984).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Negativkontrastierung) haben gezeigt, daß Tubulysin die Bildung von Tubulinaggregaten in Anwesenheit von MAPs, GTP und  $\text{Mg}^{2+}$  induzieren konnte (s. unter 4.4.1). Dabei handelte es sich um Einfachringe mit einem Durchmesser von 37-42 nm (Abb. 3.25 B und D) sowie um Doppelringe und Schaufelräder. Im Gegensatz zu Phomopsin A konnten durch Tubulysin die Schaufelräder sogar in substöchiometrischen Konzentrationen induziert werden. Sie hatten einen Gesamtdurchmesser

von 140 bis 150 nm und bestanden aus einem 40-45 nm großen Doppelring und 20 und mehr 50-55 nm langen Armen, deren Anzahl nicht genau bestimmt werden konnte. Tubulysin hemmt die Tubulinpolymerisation und führt zur Mikrotubulidepolymerisation. In beiden Fällen werden Ringe gebildet. Im Fall der Depolymerisation war die Anzahl der Ringe deutlich höher, außerdem war die Schaufelradform häufiger zu beobachten. Dies verstärkt die Hypothese, daß die Einfachringe und die Schaufelradformen sowohl aus Mikrotubuli, als auch aus Tubulineinheiten gebildet werden könnten. Diese Ringstrukturen sind bisher wenig untersucht. Tubulysin ist daher eine besonders geeignete Substanz, um solche Strukturen für eine vertiefte Untersuchung darzustellen.

## **5.8 Konkurrenz von Tubulysin zu Colchicin und Vinblastin**

Colchicin und Vinblastin haben definierte Bindungsstellen an den unpolymerisierten Tubulineinheiten. Dies wurde durch Bindungsversuche (Konkurrenzversuche) nachgewiesen (Dustin, 1984). Über die Bindung von Tubulysin an die Tubulindimere kann man auf Grund der Konkurrenzversuche folgende Aussagen machen: In den Proben konkurrierten  $^3\text{H}$ -Colchicin oder  $^3\text{H}$ -Vinblastin mit Tubulysin in verschiedenen Konzentrationen um die Bindungsstellen an Tubulin (4.5.1). Tubulysin konkurriert sehr stark mit Vinblastin (wie Dolastatin) und schwach mit Colchicin (wie Phomopsin A). Wahrscheinlich bindet Tubulysin an die Bindungsstelle von Vinblastin und verhindert die Vinblastinbindung vollständig, andererseits kann man vermuten, daß Tubulysin an oder nahe an mindestens einer Colchicin-Bindungsstelle bindet.

## **5.9 Interaktion zwischen Tubulin und Tubulysin**

Die Polymerisation von Mikrotubuli ist eine der wichtigsten Prozesse des Zellzyklus. Man versuchte, diesen Prozeß sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu erforschen. Die Polymerisation wird über Sulfhydrylgruppen des Tubulins reguliert. Die Oxidation von einer, zwei oder drei Sulfhydryl-Gruppen pro Tubulinmonomer blockiert die Polymerisation zu Mikrotubuli (Kuriyama, 1976; Mellon und Rebhun, 1976; Ikeda und Steiner, 1978). Auch Verbindungen, welche mit Tubulin-Sulfhydrylgruppen interferieren, inhibieren die Tubulinpolymerisation. So vermindern z.B. Colchicin und Vinblastin den Sulfhydryl-Titer des Tubulins, dessen



Polymerisation dabei gleichzeitig inhibiert wird. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Sulfhydrylbindung und Hemmung der Polymerisation durch einen Wirkstoff führte zur Charakterisierung des Bindungsorts am Tubulin (Ludueno und Roach, 1991).

**Iod[<sup>14</sup>C]acetamid** reagiert mit den Sulfhydrylgruppen von Proteinen und wurde als Marker für die Untersuchung der Sulfhydrylgruppen des Tubulins angewendet. Die Reaktion des Tubulins mit Iodacetamid (Alkylierung) wird durch die Bindung antimitotischer Stoffe vermindert (Kuriyama und Sakai, 1974; Schmitt und Kram, 1978).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Tubulysin auf die Alkylierung von Tubulin durch Iod[<sup>14</sup>C]acetamid bestimmt. Eine der wichtigsten Tubulin-Sulfhydrylgruppen wurde in der  $\beta$ -Tubulinuntereinheit am Cys<sup>239</sup> identifiziert (Bai, 1989). Eine Reaktion der Tubulinsulfhydrylgruppe Cys<sup>239</sup> mit den bifunktionellen Alkylierungsreagentien DCBT (2,4-Dichlorbenzylthiocyanat) bzw. EBI (N,N'-Ethylen-bis[iodacetamid]) inhibiert die Tubulinpolymerisation durch Bildung einer Quervernetzung zwischen Cys<sup>239</sup> und Cys<sup>354</sup> (Little, 1985). EBI führt zur Bildung von zwei intramolekularen Vernetzungen im  $\beta$ -Tubulin, jedoch nicht im  $\alpha$ -Tubulin. Diese Alkylierungsreagentien werden zur Untersuchung der Tubulin-Sulfhydrylgruppen angewendet. Die Bildung solcher Quervernetzungen könnte auch der Grund für strukturelle Veränderungen durch Wirkstoffe sein. Eine Vernetzung zwischen Cys<sup>239</sup> und Cys<sup>354</sup> führt zu der Tubulin-Form  $\beta^*$ , eine zweite zwischen Cys<sup>12</sup> und Cys<sup>201</sup> oder Cys<sup>211</sup> zu der Tubulin-Form  $\beta^s$  (Ludueno, 1981; Roach, 1984; Little, 1987).

Die Untersuchungen zum Einfluß von Tubulysin auf die Alkylierung von Tubulin durch Iod[<sup>14</sup>C]acetamid (4.6.1) zeigten, daß Tubulysin, Vinblastin und Phomopsin A die Alkylierung der Sulfhydrylgruppen hemmen. Die Bestimmung der Alkylierung der Tubulin-Sulfhydrylgruppen zeigt nicht, ob die Alkylierung im  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin stattfindet, außerdem unterscheidet sie nicht zwischen der Oxidation bei polymerisiertem und nicht-polymerisiertem Tubulin.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, daß Tubulysin die Quervernetzung zwischen Cys<sup>239</sup> und Cys<sup>354</sup> der  $\beta$ -Tubulinuntereinheit fördert. In der SDS-PAGE erkennt man eine  $\beta^*$ -Tubulinbande, die schneller wandert (s. unter 4.6.2).

In der Literatur findet man, daß dieses Ergebnis mit dem von Dolastatin und Phomopsin A übereinstimmt (Ludueno et al., 1990). Dolastatin und Phomopsin A inhibieren gleichzeitig die

Bildung der Quervernetzung zwischen Cys<sup>12</sup> und Cys<sup>201</sup> oder Cys<sup>211</sup> ( $\beta^s$ ) vollständig (Bai et al., 1993; Luduena et al., 1990), während Vinblastin die Bildung von  $\beta^s$  nur zum Teil inhibiert (Luduena und Roach, 1981). Die Inkubation von Tubulin mit EBI führte zur Bildung hochmolekularer Tubulinaggregate (Abb.3.30). Diese Aggregate wurden auch in Anwesenheit von Vinblastin und Colchicin gebildet, aber nicht in Gegenwart von Tubulysin und Phomopsin A.

Im Vergleich der Wirkungen von Tubulysin und den anderen, schon länger bekannten Wirkstoffen sind klare Übereinstimmungen festzustellen. Daraus läßt sich schließen, daß Tubulysin wie die bereits charakterisierten bekannten antimitotischen Stoffe seine Wirkung durch Bindung an die  $\beta$ -Tubulinuntereinheit des Heterodimers hervorruft.

Untersuchungen zeigten, daß zeit- und temperaturabhängige strukturelle Änderungen am Tubulin (Zerfall oder Decay genannt) auftreten und zur Degeneration des Moleküls führen. Fluoreszierende Verbindungen, wie Bis-1,8-anilinnaphthalensulfonat (Bis-ANS), binden an mehrere Stellen am  $\beta$ -Tubulin. Die Bindung von Bis-ANS an Tubulin nimmt mit der Zeit und mit steigender Temperatur zu und erreicht bei 37 °C ein Maximum nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Da die Zunahme der Bindung von Bis-ANS an Tubulin durch die Zunahme der Fluoreszenz bestimmt werden kann, wurde Bis-ANS als Marker für die Bestimmung des Tubulinzerfalls benutzt. Die Vorinkubation des Tubulins mit einigen antimitotischen Stoffen, wie Vinblastin, Phomopsin A und Colchicin bei 37 °C vermindert die Tubulindegeneration, während andere antimitotische Stoffe, wie Maytansin keinen Einfluß darauf haben (Luduena *et al.*, 1981; Prasad, 1986). Untersuchungen zur Wirkung von Tubulysin und Epothilon B auf die Tubulindegeneration zeigten, daß beide Substanzen einer Degeneration entgegenwirken (s. unter 4.6.3).

Es ist interessant zu erwähnen, daß Stoffe, welche die Tubulindegeneration vermindern, auch eine Tubulin-Alkylierung durch **Iod**[<sup>14</sup>C]**acetamid** inhibieren (Luduena und Roach, 1981). Das Gleiche wurde für Tubulysin festgestellt (s. unter 4.6.1.).

## 5.10 Untersuchung zur GTPase-Aktivität des Tubulins

Hirntubulin von Säugetieren enthält zwei GTP-Bindungsstellen pro Dimer, eine nichtaustauschbare an der  $\alpha$ -Tubulinuntereinheit und eine austauschbare an der  $\beta$ -Untereinheit, deren GTP während der Polymerisation hydrolysiert wird (Weisenberg, 1968; MacNeal, 1978; Jacobs, 1984). Mikrotubuliproteine enthalten ca. 25 % mikrotubuliassoziierte Proteine (MAPs), die vermutlich verschiedene Enzymaktivitäten zeigen: GTPase, ATPase, Nucleosid-5'-diphosphat-kinase und Proteinkinase (David-Pfeuty, 1977). Einige der MAPs sind biologisch sehr wichtig und beeinflussen sowohl die Tubulinpolymerisation als auch die dynamische Instabilität der Mikrotubuli (Margolis, 1979). Allgemein werden die GTP-gebundenen Tubulindimere an das wachsende Ende der Mikrotubuli addiert. So erhält der Mikrotubulus eine "Kappe" aus einem Tubulin-GTP-Komplex. Gleichzeitig läuft durch die GTPase Aktivität des Tubulins ständig eine GTP-Hydrolyse ab.

Inhibitoren der Mikrotubulipolymerisation, wie Vinblastin, Phalloidin, Dolastatin oder Podophyllotoxin inhibieren die GTPase-Aktivität des Tubulins. Colchicin stimuliert dagegen die GTPase-Aktivität leicht (David-Pfeuty, 1979).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, daß die GTPase-Aktivität des Tubulins durch Tubulysin trotz Hemmung der Polymerisation nur leicht gehemmt wurde. Die Werte des freigesetzten Phosphats waren in Gegenwart von Tubulysin noch ziemlich hoch. Die aus der GTP-Hydrolyse gewonnene Energie könnte zur Bildung der Ringstrukturen verbraucht werden (s. 4.7).

Ein Vergleich der Aktivitäten des Tubulysins mit den etablierten Wirkstoffen zeigt, daß sein Wirkungsmechanismus dem von Phalloidin und Dolastatin relativ nahe kommt. Aber es gibt auch Unterschiede. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den Tubulysinen eine neue Substanzklasse mit einer potenten antimikrotubulären und antimitotischen Wirkung charakterisiert. Tubulysin ist mit seinen antimitotischen Eigenschaften sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wirksamer als die bisher bekannten Substanzen.

## 6. Zusammenfassung

- 6.1 Tubulysin wirkt cytopathogen und hat ein sehr starkes cytotoxisches Potential. Es führte zu lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen der tierischen Zelle in Zellkulturen. Nach Zugabe von Tubulysin nahmen PtK<sub>2</sub>-Zellen (Potoroo Nierenzellen) innerhalb weniger Stunden im Vergleich zur Kontrolle eine abgerundete Gestalt an und hafteten weniger gut aneinander. Eine längere Inkubation der Zellen mit Tubulysin führte zu einer Vergrößerung der Zellen und zum Zerfall der Zellkerne, die sich in Zellkernfragmente zerteilten (Apoptose).
- 6.2 Immunfluoreszenzfärbung zeigte, daß Tubulysin die Zellmikrotubuli schon in geringer Konzentration schnell angreift. Das gesamte Mikrotubulsystem wurde innerhalb von 24 Stunden bis auf die MTOCs vollständig abgebaut. Die MTOCs verschwanden später ebenfalls. Vermutlich greift Tubulysin auch das  $\gamma$ -Tubulin an. Die PtK<sub>2</sub> Zellen konnten sich nach dem Entfernen von Tubulysin aus dem Kulturmedium auch nach mehrmaligem Waschen nicht erholen; d. h. die Wirkung von Tubulysin war irreversibel.
- 6.3 Tubulysin induziert eine Apoptose, die sich in einer konzentrationsabhängigen Zunahme von cytoplasmatischen Mono- und Oligonukleosomen und einer Zunahme von DNA-Fragmenten im Cytoplasma zeigte. Elektrophoretisch konnte eine sogenannte Apoptoseleiter bei U-937 Zellen nach Behandlung mit Tubulysin A oder Tubulysin D nachgewiesen werden.
- 6.4 Eine kombinierte Zugabe von (die Mikrotubuli stabilisierendem) Taxol oder Epothilon B und Tubulysin zeigte, daß die Wirkung von Tubulysin auf die Zellmikrotubuli durch die beiden Substanzen nicht beeinflußt wird.
- 6.5 Tubulysin blockiert die Bildung von Mitosespindeln, die für eine Segregation der Tochterchromosomen bei der Mitose verantwortlich sind. Zellzyklus-Untersuchungen zeigten, daß die Zellen nach der Zugabe von Tubulysin in der G<sub>2</sub>/M-Phase akkumulierten.

- 6.6 Tubulysin hemmt die Tubulinpolymerisation *in vitro*. Bei Zugabe verschiedener Tubulysin-Konzentrationen (0 bis 2  $\mu\text{M}$ ) konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Tubulysin festgestellt werden. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert des Tubulysins betrug 0,75  $\mu\text{M}$  für eine Tubulinkonzentration von 1,25 mg/ml (10  $\mu\text{M}$ ).
- 6.7 Tubulysin hemmt die Tubulinpolymerisation *in vitro* auch in Anwesenheit von Taxol oder Epothilon. Auch mit Taxol oder Epothilon stabilisierte Mikrotubuli wurden nach Zugabe von Tubulysin depolymerisiert.
- 6.8 Das Tubulysin depolymerisiert *in vitro* die Mikrotubuli. Nach einer Zugabe von 3  $\mu\text{M}$  Tubulysin zu *in vitro* gebildeten Mikrotubuli ging die Extinktion aber nur um ca. 40 % zurück. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß Tubulysin sowohl die Tubulinpolymerisation blockiert als auch eine Depolymerisierung der Mikrotubuli fördert. Tubulysin bewirkt nicht einfach den Abbau der Mikrotubuli in ihre Bausteine, die Tubulindimere, sondern die Bildung oligomerer Ringstrukturen und schaufelradartiger Gebilde.
- 6.9 Tubulysin konkurriert sehr stark mit Vinblastin um dessen Bindungsstellen und verhinderte vollständig die Vinblastinbindung am Tubulin, aber nur schwach die von Colchicin. Es bindet wahrscheinlich an die Bindungsstelle von Vinblastin und an oder nahe an mindestens einer Colchicin-Bindungsstelle.
- 6.10 Die Untersuchungen zum Einfluß von Tubulysin auf die Alkylierung von Tubulin durch Iod[ $^{14}\text{C}$ ]acetamid zeigten, daß Tubulysin, wie Vinblastin und Phomopsin A, die Alkylierung der Sulfhydrylgruppen hemmt.
- 6.11 Tubulysin fördert die Quervernetzung zwischen  $\text{Cys}^{239}$  und  $\text{Cys}^{354}$  der  $\beta$ -Tubulinuntereinheit, wie durch SDS-PAGE nachgewiesen wurde.
- 6.12 Tubulysin und Epothilon B vermindern zeit- und temperaturabhängige strukturelle Veränderungen am Tubulin (Zerfall oder Tubulindegeneration).

- 6.13 Die GTPase-Aktivität des Tubulins wurde durch Tubulysin trotz Hemmung der Polymerisation nur leicht gehemmt. Die Werte des freigesetzten Phosphats blieben in Gegenwart von Tubulysin ziemlich hoch. Die aus der GTP-Hydrolyse gewonnene Energie könnte zur Bildung der Ringstrukturen verbraucht werden.
- 6.14 Im Vergleich der Wirkungen von Tubulysin und der anderen schon länger bekannten Wirkstoffe sind klare Übereinstimmungen festzustellen. Daraus läßt sich schließen, daß Tubulysin seine Wirkung durch Bindung an die  $\beta$ -Tubulinuntereinheit des Heterodimers hervorruft und sein Wirkungsmechanismus dem von Phalloidin A und Dolastatin10 relativ nahe kommt.

## 7. Literaturverzeichnis

Amos, L. A., Structure of microtubules, *In*:Robert, K. Hyams, J. S., Hrsg: Microtubule. Academic Press, New York; 1-64 (1979)

Andreu, J. M., Gorbunoff, M. J., Lee, J. C., Timasheff, S. N.: Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogue: an equilibrium study, *Biochemistry* **23**; 1742-1752 (1984)

Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H.: Apoptosis: The role of endonuclease. *Am J. Pathol.*, **136**; 593-608 (1990)

Bai, R. L., Lin, C. M., Nguyen, N. Y., Liu, T. Y., Hamel, E.: Identification of the cysteine residue of  $\beta$ -tubulin alkylated by the antimitotic agent 2,4-Dichlorobenzyl thiocyanate, facilitated by separation of the protein subunits of tubulin by hydrophobic column chromatography, *Biochemistry* **28**; 5606-5612 (1989)

Bai, R., George, R., Pettit, R., Hamel, E.: Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal, *Biochemical Pharmacology*, **39 (12)**; 1941-1949, (1990)

Bai, R., Taylor, G. R., Schmidt, J. M., Williams, M. D., Kepler, J. A., Pettit, G. R., Hamel, E.: Interaction of dolastatin 10 with tubulin: induction of aggregation and binding and dissociation reactions, *Molecular Pharmacology*, **47**; 965-976 (1995)

Berkowitz S. A., Katagiri; H.-K., Binder, R. C. Williams: Separation and characterization of microtubule proteins from calf brain, *Biochemistry* **16**: 5610 (1977)

Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hesens, O., Koupal, L. Liesch, L., Goetz, M., Lazarides, E. Woods, C. M.: Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action, *Cancer Res.***55**: 2325-2333 (1995)

Borisy, G.: A rapid method for quantitative determination of microtubule protein using DEAE-

cellulose filter, *Analyt. Biochem.* **50**; 373-385 (1972)

Borisy, G. G., Olmsted, J. B.: Nucleated assembly of microtubules in porcine brain extracts, *Science* **177**; 1196-1197 (1972)

Borisy, G. G., Olmsted, J. B. Klugman, R. A.: In vitro aggregation of cytoplasmic microtubule subunits, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69(10)**; 2890-2894 (1972)

Brade, W. P. Niemeyer, U.: Zytostatika in: Arzneimittel-Forschritte 1972-1985; Kleemann A., Lindner E., Engel J. (Hrsg); Verlag VCH, Weinheim, (1987)

Carboni, J. M., Farina V., Rao, S., Hauck, S. I., Horwitz, S. B., Ringel, I.: Synthesis of a photoaffinity analog of taxol as an approach to identify the taxol binding site on microtubule, *J. Med. Chem.* **36**; 1918-1922 (1993)

Chaudhuri, A. R., Luduena, R. F.: Interaction of phalloidin A with the normal and subtilisin-treated bovine brain tubulin, *J. Protein Chem.* **16(2)**; 99-105 (1997)

Cohen, J., Duke, R.C.: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei lead to cell death, *J. Immunol.* **132**; 38-42 (1984)

Daniel, M., Bollag, D.: Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action, *Cancer Res.* **55**, 2325-2333 (1995)

David-Pfeuty, T., Simon, C., Pantaloni, D.: Effect of antimitotic drugs on tubulin GTPase activity and self-assembly, *J. Biol. Chem.* **254**; 11696-11702, (1979)

Denizot, F. Lange, R. : Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improvement sensibility and reliability, *J. Immunol. Meth.* **89**; 271-277 (1986)



Derry, W. B., Wilson, L., Jordan, M. A.: Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamic, *Biochemistry*, **34**; 2203-2211 (1995)

Dustin, P.: Microtubules, Springer, Berlin (1984)

Eastmann, A., Grant, S., Lock, R., Tritton, T., VanHouten, N., Yuan, J.: Cell death in cancer and development: AACR special conference in cancer research, *Cancer Res.* **54**; 2812 (1994)

Engelborghe, Y., DE Maeyer, L. C., Overbergh, N: A kinetic analysis of the assembly of the microtubules in vitro, *FEBS Letters* **80**; 81-85 (1977)

Gaskin, F., Frieriksen, D. W., Cunningham, L. W.: Techniques for the study of microtubule assembly *in vitro*, *Methods in Enzymology, Academic Press, London* **85**; 433-439 (1982)

Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H., Reichenbach, H.:Epothilon A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria), production, physico-chemical and biological properties, *J. Antibiotics* **49 (6)**; 560-563 (1996)

George, C., Na, Timashiff, S. N.: Interaction of calf brain tubulin with glycerol, *J. Mol. Biol.* **151**; 165-178 (1981)

Gratzner, H. G.: Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication, *Science* **218**; 474-475 (1982)

Green, L. M., Reade, J. L., Ware, C. F.: Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines, *J. Immunol. Meth.* **70**; 257-268 (1984)

Gronewold, T., Sasse, F., Lünsdorf, H., Reichenbach, H.: Effect of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells, *Cell Tissue Res.* **295**; 121-129 (1999)

Hamel, E., Lin, C. M.: Glutamate-induced polymerisation of tubulin: characteristics of the reaction and application to the large-scale purification of tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **209**; 29-40 (1981)

Hamel, E.: Antimitotic natural products and their interaction with tubulin, *Med. Res. Rev.*, **16(2)**; 207-231 (1996)

Höfle, G. Bedorf, N., Gerth, K., & Reichenbach, H. Patent **DE 4138042** (1993)

Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schoumburg, D., Gerth, K., Reichenbach, H.: Epothilon A and B novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: Isolation, crystall structure, and conformation in solution, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**; 1567-1569 (1996)

Horio, T., Hotani, H.: Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy, *Nature* **321**; 605-607 (1986)

Howard, W. D., Timasheff, S. N.: Linkages between the effects of taxol, colchicine and GTP on tubulin polymerization. *J. Biol. Chem.* **263**; 1342-1346 (1988)

Horowitz, P., Prasad, V., Luduena, R.F.: Bis(1,8-anilinonaphthalenesulfonat): a novel and potent inhibitor of microtubule assembly, *J. Biol. Chem.* **259**; 14647-14650 (1984)

Horwitz S. B., Fant J., Schiff, P. B.: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol, *Nature* **277**; 665-667 (1979)

Ikeda, Y., Steiner, M.: Sulfhydryls of platelet tubulin: their role in polymerization and colchicine binding, *Biochemistry* **17**; 3454-3459 (1978)

Ithoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis, *Cell* **66**; 233-243 (1991)

Jacobs, M., Smith, M., Taylor, E. W.: The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules, *J. Mol. Biol.* **89**; 455-468 (1974)

Jameson, L. Caplow, M.: Effect of guanosine diphosphate on the microtubule assembly and stability, *J. Biol. Chem.*, **255**; 2284-2292, (1980)

Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E., Poirier, G. G.: Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.* **53**; 3976-3985 (1993)

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *Brit. J. Cancer* **26**; 239-257 (1972)

Kirschner, M. W.: Microtubule assembly and nucleation, *Int. Rev. Cytol.* **54**; 1-71 (1978)

Kirschner, M., Mitchison, T.: Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis, *Cell* **45**; 329-342 (1986)

Kowalski J. R., Giannakakou, P., Hamel, E.: Interaction of epothilones with tubulin polymers, *J. Biol. Chem.*, **272**(4); 2534-2541 (1997)

Kuriyama, R.: In vitro polymerization of flagellar and ciliary outer fiber tubulin into microtubules, *J. Biochem. (Tokyo)* **80**; 153-165 (1976)

Kuriyama, R., Sakai, H.: Role of tubulin -SH groups in polymerization to microtubules, *J. Biochem. (Tokyo)* **76**; 651-654 (1974)

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685( 1970)

Little, M., Luduena, R. F.: Structural differences between brain  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin: implications for microtubule assembly and colchicine binding, *EMBO J.* **4**; 51-56 (1985)

Little, M., Luduena, R. F.: location of two cysteines in brain  $\alpha$ -tubulin that can be cross-linked after removal of exchangeable GTP, *Biochem. Biophys Acta* **912**; 28-33 (1987)

Luduena, R. F., Roach, M. C.: Interaction of tubulin with drugs and alkylating agents: 1-Alkylation of tubulin by iodo[ $^{14}$ C]acetamide and N,N'-ethylenebis(iodoacetamide), *Biochemistry* **20**; 4437-4444 (1981a)

Luduena, R. F., Roach, M. C.: Contrasting effects of maytansine and vinblastine on the alkylation of tubulin sulfhydryls, *Arch Biochem. Biophys* **210**; 498-504 (1981b)

Luduena, R. F., Roach, M. C., Prasad, V., Lacey E.: Effect of phalloidin A on the alkylation of tubulin, *Biochem. Pharmacol.* **39**; 1603-1608 (1990)

Luduena, R. F., Roach, M. C.: Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and anti microtubule agents, *Pharmacol. Ther.* **49**; 133-152 (1991)

MacNeal, R. K., Purich, D. L.: Stoichiometry and role of GTP hydrolysis in bovine neurotubule assembly, *J. Biol. Chem.* **253**; 4683-4687 (1978)

Mandelkov, E., Mandelkov, E-M. Bordas, J.: Structure of tubulin rings studied by X-ray scattering using synchrotron radiation, *J. Mol. Biol.* **167**; 179-196, (1983)

Margolis, R. L., Rauch, C. T., Wilson, L.: Mechanism of colchicine-dimer addition to microtubule ends: implication for the microtubule polymerization mechanism, *Biochemistry* **19**; 5550-5557, (1980)

Margolis, R. L. Wilson, L.: Addition of colchicine-tubulin complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A* **74**; 3466-

3470 (1977)

Margolis, R. L. Wilson, L.: Regulation of the microtubules steady state in vitro by ATP, *Cell* **18**; 623-629 (1979)

Melki, R., Fievez, S., Carlier, M.-F.: Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay, *Biochemistry* **35**; 12038-12045 (1996)

Mellon, M. G., Rebhun, L. I.: Sulfhydryls and the in vitro polymerization of tubulin, *J. Cell Biol.* **70**; 226-238 (1976)

Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwig E. A., Yuan J.: Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*, *Cell* **75**: 653-660 (1993)

Mitchison, T., Kirschner, M.: Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes, *Nature* **312**; 232-237 (1984)

Mitchison, T. Kirschner, M.: Dynamic instability of microtubule growth, *Nature* **312**; 237-242 (1984)

Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Meth.* **65**; 55-63 (1983)

Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R., Sikorska, M.: Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragment prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation, *EMBO J.* **12(9)** ; 3679-3684 (1993)

- Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Waier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, L., Tranth, B. C., Ponsting, H. Krammer, P. H.: Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor-necrosis factor/ nerve growth factor receptor superfamily, *J. Biol. Chem.* **267**; 10709-10715 (1992)
- Olmsted, J. B. Borisy, G. G.: Characterization of microtubule assembly in porcine brain extracts by viscometry, *Biochemistry* **12** (21); 4282-4289 (1973)
- Oosawa, F. Askura, S.: Thermodynamics of the polymerisation of protein, *Academic Press, London* (1975)
- Prasad, A. R. S., Luduena, R. F., Horowitz, P. M.: Bis(8-anilinonaphthalene-1-sulfonate) as a probe for tubulin decay, *Biochemistry* **25**; 739-742 (1986)
- Purich, D.L., Kristofferson, D.: Microtubule assembly: A review of progress, principles and perspectives, *Adv. Prot. Chem.*, **36**; 133--212 (1984)
- Reichenbach, H.: Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaroytes. In: Rosenberg, E. (Hrsg.), *Myxobacteria, development and cell interactions*. Springer Verlag, New York, 1-50 (1984)
- Reichenbach, H., Dworkin, M.: The order myxobacterales. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H.G. (Hrsg.), *The prokaryotes*, 2. Aufl. Springer Verlag, New York (1992)
- Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **17**; 208-212 (1963)
- Rowinsky, E. K., Donehower, R. C.: Taxol: twenty years later, the story unfolds. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**; 1778-1781 (1991)

Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M., Arbuck, S. G.: Taxol: the first of taxanes, an important new class of antitumor agents, *Sem. Oncol.* **19**; 646-662 (1992)

Runge, M. S., Detrich, H. W., Williams, R. C.: Identification of the major 68000-Dalton protein of microtubule preparation as a 10-nm filament protein and its effects on microtubule assembly in vitro, *Biochemistry* **18**; 1689-1698 (1978)

Sarker, N., Mukhopadhyay, K., Parrack, P. K., Bhattachatyaa, B: Aging of tubulin monomers using 5,5'-bis(8-anilino-1-naphthalenesulfonate) as a probe, *Biochemistry* **34**; 13367-13373 (1995)

Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T., Reichenbach, H.: The chondramides: Cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton, *J. National Cancer Institut* **90 (20)**; 1559-1563 (1998)

Scheele, R. B., Borisy, G. G., Robert, K. Hyams, J. S.: Microtubules, Academic Press; 217-254 (1979)

Schiff, P. B., Fant, J., Horwitz, S. B.: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol, *Nature (Lond.)*, **277**; 665-667 (1979)

Schmitt, H. Kram, R.: Binding of antimitotic drugs around cysteine residues of tubulin, *Exp. Cell Res.* **115**; 408-411 (1978)

Shelanski, M. L., Gaskin, F. Cantor, C. R.: Microtubule assembly in the absence of added nucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **70**; 765-768 (1973)

Singer, W. D., Himes, R. H.: Cellular uptake and tubulin binding properties of four vinca alkaloids, *Biochem. Pharmacol.* **43**; 545-551 (1992)

Skalka, M., Matysova, J., Cejkova, M.: DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues

degrades in vivo into regular fragments, *FEBS Lett.*, **12**; 72, 271 (1976)

Smith, C. D., Zhang, X., Mooberry, S. L., Patterson, G. M. L., Moore, R. E.: Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells, *Cancer Res.* **54**; 3779-3784 (1994)

Spann, U., Renner, W., Mandelkow, E.-M., Bordas, J.: Mandelkow, E.: Tubulin oligomers and microtubule assembly studied by time-resolved X-ray scattering: separation of pre-nucleation and nucleation events, *Biochemistry* **26**; 1123-1132 (1987)

Stryer, L.: Biochemistry, 4. Auflage, Spektrum Akad. Verl., New York, Heidelberg, Berlin (1991)

Spurr, A. R., A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultrastruct. Res.*, **26**; 31-43 (1969)

Taylor, I. W.: A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorimetry, *J. Histochem. Cytochem.* **28**; 102-104 (1980)

Tepper, C. G., Studzinski, G. P.: Resistance of mitochondrial DNA to degradation characterizes the apoptotic but not the necrotic mode of human leukemia cell death, *J. Cell. Biochem.* **52** (3); 352-361 (1993)

Terry, B. J., Purich, D. L., Nucleotide release from tubulin and nucleoside-5'-diphosphate kinase action in microtubule assembly, *J. Biol. Chem.* **254**; 9469-9476 (1979)

Tonsing, E. M., Steyn, P. S., Osborn, M., Weber, K.: Phalloidin A, the causative agent of lupinosis, interacts with microtubules in vivo and in vitro, *Eur. J. Cell Biol.* **35**: 156-164 (1984)

Valle R. B., Borisy G. G.: The non-tubulin component of microtubules protein oligomers: effect on self association and hydrodynamic properties, *J. Biol. Chem.* **253**(8); 2834-2845 (1977)



Vallee, R. B. Reversible assembly purification of microtubules without assembly-promoting agents and further purification of tubulin, microtubule-associated proteins and MAP fragments, *Methods Enzymol.* **134**; 89-104 (1986)

Voet D., Voet J., G., *Biochemistry*, VCH-Verlag, Weinheim, New York (1994)

Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voetr, W. A., Erickson, H.P. Salmon, E. D.: Dynamic instability of individual microtubules analysed by video light microscopy: rate constant and transition frequencies, *J. Cell Biol.*, **107**; 1437-1448 (1988)

Walker, P. R., Weaver, V. M., Lach, B., Leblanc, J., Sikorska M.: Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis, *Exp. Cell Res.*, **213** (1); 100-106 (1994)

Wani, M.C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T.: Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**; 2325-2327 (1971)

Weisenberg, R. C., Borisy, G., Taylor, E. W.: The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules, *Biochemistry* **7**; 4466-4479 (1968)

Wong, P., Pineault, J., Lakins, J., Taillefer, D., Leger, J., Wang, Tenniswood, M.: Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis, *J. Biol. Chem.* **268**: 5021-531 (1993)

Wylie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, **284**; 555-556 (1980)

Wylie, A. H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D.: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis, *J. Pathol.* **142**; 67-77 (1984)

Zong Z., Fujikawa K., Kouhei T. Y., Yamagishi H., Tanino M., Odashima S.: Potentiation of K252a, a protein kinase inhibitor-induced polyploidization by cAMP in cultured fibrosarcoma cell line, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**(1): 746-750 (1994)